

DIE GLEICHZEITIGE BESTIMMUNG DER
POOLGRÖSSEN UND SYNTHESERATEN
DER PRIMÄREN GALLENSÄUREN MITTELS
KAPILLARGASCHROMATOGRAPHISCH-
MASSENSPEKTROMETRISCHER MESSUNG
VON $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -ISOTOPENVERHÄLTNISSEN
IM SERUM NACH ORALER APPLIKATION
STABIL MARKIERTER GALLENSÄUREN

Frans Stellaard

Diss
München
1985

Aus der II. Medizinischen Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. G. Paumgartner

DIE GLEICHZEITIGE BESTIMMUNG DER POOLGRÖßEN UND SYNTHESERATEN
DER PRIMÄREN GALLENSÄUREN MITTELS KAPILLARGASCHROMATOGRAPHISCH -
- MASSENSPEKTROMETRISCHER MESSUNG VON $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ - ISOTOPENVERHÄLT-
NISSEN IM SERUM NACH ORALER APPLIKATION STABIL MARKIERTER GAL-
LENSÄUREN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der Humanbiologie
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

DIPL. ING. FRANS STELLAARD

aus

MÜNCHEN

Jahr

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. G. Paumgartner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. Scholz

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 9.7.1985

Für Maria,

Jelena und Jan

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2. STRUKTUR UND PATHOPHYSIOLOGIE DER GALLENSÄUREN	3
2.1. Struktur	3
2.2. Konjugation und Sulphatierung	5
2.3. Physiologie der Gallensäuren	6
2.3.1. Biosynthese der Gallensäuren	6
2.3.2. Enterohepatischer Kreislauf der Gallensäuren	7
2.3.3. Störungen des enterohepatischen Kreislaufes	9
3. GALLENSÄURENKINETIK	12
3.1. Kinetisches Modell	12
3.2. Isotopenverdünnungsmethode	13
3.2.1. Einsatz stabiler Isotopen	16
3.3. Ziele der Studie	17
4. MESSUNG DES ISOTOPENVERHÄLTNISSSES VON GALLENSÄUREN	19
4.1. Physikalische Grundlagen	19
4.2. Isotopenverhältnismessungen an Gallensäuren	19
4.2.1. Isolierung der Gallensäuren aus biologischem Material	21
4.2.2. Desulphatierung und Dekonjugation	22
4.2.3. Extraktion und Derivatisierung der dekonjugierten Gallensäuren	23
4.3. Gaschromatographische Trennung der Gallensäure-derivate	24
4.3.1. Das Prinzip der Gaschromatographie	24
4.3.2. Die kapillargaschromatographische Trennung von Gallensäuren-Methyl-TMS-Derivaten	25
4.3.3. Injektionstechniken	26
4.4. Massenspektrometrie der Gallensäuren-Methyl-TMS-Derivate	26
4.4.1. Prinzip der Massenspektrometrie	26
4.4.2. Das Massenspektrum	28
4.4.3. Selected Ion Monitoring (SIM)	28
4.4.4. Isotopenverhältnismessungen	29

	Seite
4.4.5. Fragmentierung der Gallensäuren-Methyl- -TMS-Derivate	31
4.4.5.1. Elektronenstoßionisierung	31
4.4.5.2. Chemische Ionisierung	31
4.4.6. Empfindlichkeitsbestimmende Faktoren	32
5. BERECHNUNG DER POOLGRÖßE UND DER SYNTHESERATE	36
5.1. Atom percent excess, Poolgröße und Syntheserate	36
5.2. Genauigkeitsbedingungen für die Isotopenver- hältnismessungen	37
6. EXPERIMENTELLER TEIL	38
6.1. Protokoll	38
6.2. Probenvorbereitung	38
6.3. Gaschromatograph-Massenspektrometer	39
6.3.1. Gaschromatographische Bedingungen	39
6.3.2. Massenspektrometrische Bedingungen	40
6.3.3. Mathematische Beschreibung der Abnahme des Atom percent excess-Wertes	42
7. ERGEBNISSE	43
7.1. Isotopentrennung	43
7.2. Reproduzierbarkeit der Isotopenverhältnis- messungen	43
7.3. Genauigkeit der Atom percent excess-Bestimmungen	45
7.4. Biologische und meßtechnische Streuung der ge- messenen Poolgrößen, fraktionellen Umsatzraten und Syntheseraten	46
7.5. Vergleiche der kinetischen Parameter gemessen im Serum und in der Galle	47
7.6. Ergebnisse bei gesunden Probanden	48
8. DISKUSSION	49
ZUSAMMENFASSUNG	54
LITERATURVERZEICHNIS	57
APPENDIX	66
DANKWORT	68
LEBENS LAUF	69
PUBLIKATIONS LISTE	70

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Viele hepatobiliäre und gastrointestinale Erkrankungen sind entweder Ursache oder Folge einer Störung des enterohepatischen Kreislaufes der Gallensäuren. So können Lebererkrankungen die Biosynthese und/oder die biliäre Exkretion der Gallensäuren drastisch ändern (47,50,99,130). Entzündliche Erkrankungen des terminalen Ileums beeinträchtigen die Resorption der Gallensäuren und können ein Gallensäurenverlustsyndrom verursachen (59,94,101,108,135), welches die Leber zu einer, oft maximal, gesteigerten Gallensäurensynthese zwingt. Andererseits wurde gezeigt, daß die Bildung cholesterinreicher Gallenblasensteine durch ein gestörtes Cholesterin/Gallensäurenverhältnis in der Galle verursacht wird, welches durch einen verringerten Gallensäurenpool bedingt sein kann (95,115,137). Hinweise auf einen gestörten enterohepatischen Kreislauf der Gallensäuren können oft mit Hilfe relativ einfacher Nachweismethoden für Gallensäuren im Serum, Urin, Stuhl oder in der Galle gefunden werden.

Eine Interpretation dieser Ergebnisse ist meistens sehr schwierig, da Rückschlüsse auf Pool- oder Syntheseänderungen nicht oder mit nur wenig Sicherheit gezogen werden können. Die direkte Messung der Poolgröße, der fraktionellen Umsatzrate und der Syntheserate der primären Gallensäuren Cholsäure und Chenodesoxycholsäure, welche in der Leber aus Cholesterin synthetisiert werden, wird mit Hilfe der Isotopenverdünnungsmethode nach Lindstedt (75) durchgeführt. Diese Methode beinhaltet die Bestimmung des Verdünnungsgrades einer verabreichten markierten homologen Gallensäure im natürlichen Pool, und die Bestimmung der Geschwindigkeit, mit der die markierte Substanz durch natürliche Substanz ersetzt wird (75,60). In der ursprünglichen Form dieser Methode wurde eine radioaktive ^{14}C - oder eine ^3H markierte Gallensäure verabreicht und die Abnahme der spezifischen Aktivität in bis zu 9 Tagen täglich abgenommenen Duodenalgalleproben gemessen (75). Mit dem Ziel, die Methode auch Schwangeren und Neugeborenen zugänglich zu machen, führten Klein und Mitarbeiter in den frühen 70er Jahren ^{13}C - und ^2H markierte

Gallensäuren und deren Messung in der Galle mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie ein (69,70,139). Die Gallesammlung war noch immer notwendig, da die analytische Methodik nicht empfindlich genug war, die Messungen im peripheren Blut eines Probanden mit normalen Serumgallensäurenspiegel durchzuführen. Die Gallensäurenkonzentration im Serum ist nämlich um den Faktor 10.000 niedriger als in der Galle.

Erst mit Hilfe neuer Extraktionsmethoden, größerer Serummengen (5 ml) und einer neuen chemischen Ionisationsmethode mit Ammoniak wurden erste Messungen des natürlichen Isotopenverhältnisses im Serum von der gleichen Gruppe erfolgreich durchgeführt (27). Bis heute liegen in der Literatur aber nur 3 Abstrakte vor (38,39,44), die kinetische Daten beschreiben, die mit Hilfe stabil markierter Gallensäuren und Blutabnahmen ermittelt wurden. Gleichzeitige Bestimmungen der Poolgrößen, fraktionellen Umsatzraten und Syntheseraten von Cholsäure und Chenodesoxycholsäure wurden im Serum noch nicht durchgeführt.

Das Ziel dieser Dissertationsarbeit war es daher, eine eigene Methode zu entwickeln, die es erlaubt, in geringen Serummengen (max. 2 ml) die Bestimmung der Poolgrößen, fraktionellen Umsatzraten und Syntheseraten von primären Gallensäuren simultan im Serum durchzuführen. Die analytischen Überlegungen zur Methodeentwicklung und die Methodenvalidierung werden in dieser Arbeit beschrieben. Ebenso wurde geprüft, inwiefern die im systemischen Kreislauf durchgeführten Messungen den direkt im enterohepatischen Kreislauf gemessenen Werten entsprechen. Diese Vergleiche wurden bei 3 gesunden Probanden vorgenommen, bei denen keine Hinweise für Störungen der Leberfunktion, Gallesekretion oder Gallensäurenresorption vorlagen.

2. STRUKTUR UND PATHOPHYSIOLOGIE DER GALLENSÄUREN

2.1. Struktur

Die chemische Struktur der Gallensäuren ist abzuleiten von der 5β -Cholansäure, deren Struktur durch ein C_{17} - Steroidskelett und eine C_5 -Seitenkette, die in der C_{17} -Position mit dem Steroidskelett verbunden ist, charakterisiert wird. Zusätzlich befinden sich ein H-Atom in der β -Stellung der C_5 -Position und zwei CH_3 -Gruppen an der C_{10} und C_{13} -Position (Abb.1). Der Gallensäurenpool von gesunden Probanden besteht hauptsächlich aus 5 verschiedenen Gallensäuren, die sich durch die Anzahl der Hydroxylgruppen und deren Positionen, in denen sie am 5β -Cholansäuremolekül verbunden sind, unterscheiden. Man unterscheidet primäre, sekundäre und tertiäre Gallensäuren. Die primären Gallensäuren werden in der Leber direkt aus Cholesterin durch Epimerisierung der 3β -Hydroxylgruppe in eine 3α -Hydroxyl-

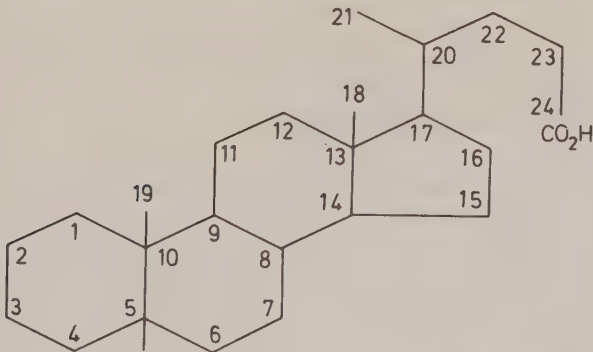


Abb. 1. Chemische Struktur der 5β - Cholansäure.

gruppe, und Hydroxylierung an der 7α - und/oder 12α -Position synthetisiert. Zusätzlich findet eine Verkürzung und Oxidation der Seitenkette statt. Hierdurch entstehen die folgenden Produkte: 3α , 7α dihydroxy 5β -Cholansäure (Chenodesoxycholsäure) und 3α , 7α , 12α trihydroxy 5β -Cholansäure (Cholsäure) (Abb.2). Die sekundären Gallensäuren entstehen im Darm als bakterielle Abbauprodukte der primären Gallensäuren durch eine 7α -Dehydroxylierung. So entsteht aus Cholsäure 3α , 12α -dihydroxy 5β -Cholansäure (Desoxycholsäure) und aus Chenodesoxycholsäure 3α hydroxy 5β -Cholansäure (Lithocholsäure). Tertiäre Gallensäuren entstehen aus den primären Gallensäuren über ein oder mehrere Zwischenprodukte, wobei keine dehydroxylierenden Enzyme an der Bildung beteiligt sind. Dies trifft bei Gesunden für die 3α , 7β dihydroxy 5β -Cholansäure (Ursodesoxycholsäure) zu.

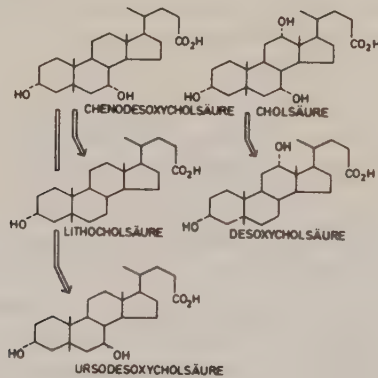


Abb.2. Chemische Struktur der fünf wichtigsten, im Menschen vorkommenden Gallensäuren.

2.2. Konjugation und Sulphatierung

Gallensäuren sind von ihrer Struktur her bei einem physiologischen pH-Wert sehr wenig wasserlöslich. Diese Eigenschaft wird aber durch eine Konjugation mit Glyzin und Taurin aufgehoben (122) und sie erhalten so eine detergentienähnliche Eigenschaft. Dazu werden diese Aminosäuren mittels einer Peptidbindung an die Carboxylgruppe der Gallensäuren gekoppelt (Abb.3). Da die Lithocholsäure nach dieser Konjugation noch immer schlecht wasserlöslich ist, wird sie zuzätzlich noch in der C₃-Position sulphatiert (97,98). Auch die anderen Gallensäurekonjugate werden zu unterschiedlichen Graden, aber geringer als Lithocholsäure, sulphatiert (82).

Ionogen gelöste Gallensäurekonjugate werden allgemein als Gallensalze bezeichnet. Die Bezeichnungen Gallensäuren und Gallensalze werden aber in der Praxis nebeneinander benutzt.

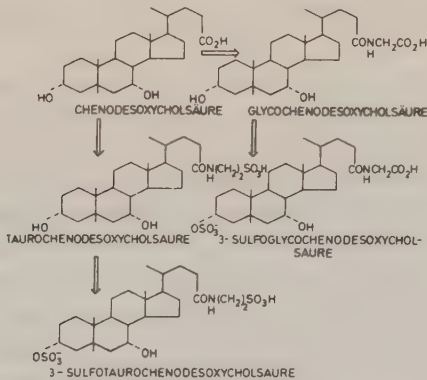


Abb. 3. Die Konjugation und Sulfatierung der Chenodesoxycholsäure.

2.3. Physiologie der Gallensäuren

Konjugierte primäre Gallensäuren bilden die Hauptstoffwechselprodukte des Cholesterins und spielen eine wichtige Rolle im Transport von nicht metabolisiertem Cholesterin, das über biliäre Sekretion aus der Leber entfernt wird. Hierzu wird das Cholesterin durch gemischte Mizellen von Gallensäuren und Phospholipiden in der Galle in Lösung gehalten (84,58). Nach Speicherung in der Gallenblase werden die Gallensäuren durch Kontraktion der Gallenblase mit der Galle in das Duodenum ausgeschieden. Dort fördern sie die Spaltung der mit der Nahrung in den Dünndarm gelangten Fette und die Resorption der Fettsäuren. Hauptsächlich im terminalen Ileum (28,72), aber auch schon in höheren Abschnitten des Dünndarms (6,72) findet die Resorption von Gallensäuren statt. In den folgenden Kapiteln sollen die Synthese der primären Gallensäuren, ihre Resorption aus dem Darm, die bakterielle Umwandlung in die sekundären und tertiären Gallensäuren und die Aufnahme der resorbierten Gallensäuren in die Leber kurz erläutert werden.

2.3.1. Biosynthese der Gallensäuren

Cholsäure und Chenodesoxycholsäure werden in der Leber direkt aus nicht verestertem, neu synthetisiertem Cholesterin gebildet (15,17). Hierbei wird zunächst das Steroidringsystem mittels mikrosomaler Enzyme in der 7 α und 12 α -Position hydroxyliert. Außerdem wird die 3 β -Hydroxylgruppe des Cholesterins durch Oxidierung und Hydrogenierung in eine 3 α -Hydroxylgruppe umgewandelt. Der erste Schritt dieses Prozesses ist die 7 α -Hydroxylierung, die auch der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion ist (17). Die Seitenkette wird in der mitochondrialen und mikrosomalen Fraktion der Leberzelle oxydativ verkürzt. Dieser Prozess wird mit einer 26-Hydroxylierung initiiert (50,51,83), es ist aber auch ein alternativer Syntheseweg, der mit einer 25-Hydroxylierung beginnt, beschrieben worden (116).

Die neusynthetisierten Gallensäuren und auch aus dem Darm resorbierte, dekonjugierte Gallensäuren werden in der Leber in einem

durchschnittlichen Verhältnis von 3:1 mit Glyzin und Taurin konjugiert (45). Bei gesunden Probanden werden täglich 0.2 - 0.6g an Gallensäuren synthetisiert, wobei die Syntheserate für Cholsäure geringfügig höher ist als diejenige für Chenodesoxycholsäure. Desoxychol- und Lithocholsäure werden vorwiegend im Dickdarm aus Cholsäure und chenodesoxycholsäure über eine gemeinsame 7α -Dehydroxylasereaktion gebildet. Diese 7α -Dehydroxylierung findet hauptsächlich nach einer Dekonjugation statt und verläuft unter Einfluß anaerober Bakterien (8,9,41,57,110,129). Bestimmende Parameter für die Effektivität dieses Prozesses sind das pH des Dickdarms (79,128) und die Passagegeschwindigkeit. Ursodesoxycholsäure wird möglicherweise über das bakterielle Zwischenprodukt 7 oxo, 3α hydroxy 5β -Cholansäure aus Chenodesoxycholsäure synthetisiert (43,112). Ein Teil der Ursodesoxycholsäure wird im Dickdarm mittels einer 7α -Dehydroxylierung in Lithocholsäure umgewandelt (12,143).

2.3.2. Enterohepatischer Kreislauf der Gallensäuren (Abb.4)

Nach ihrer Synthese werden die konjugierten Gallensäuren über die Kanalikuli der Leber in die Galle ausgeschieden. Im nüchternen Zustand gelangt der größte Teil davon in die Gallenblase, 10 - 40% der Gallensäuren gelangen aber direkt in den Darm (87). Durch Kontraktion der Gallenblase, meist durch Nahrungsaufnahme stimuliert, gelangen die Gallensäuren mit der Galle in das Darmlumen, wo sie durch aktive Resorption hauptsächlich im terminalen Ileum resorbiert werden (28,72). Dies gilt besonders für die am meisten polaren Gallensäurekonjugate wie Taurocholol und Glycocholol. Die Taurinkonjugate der Dihydroxygallensäuren werden ebenfalls zum größten Teil aktiv resorbiert, während die Glyzinkonjugate dieser Verbindungen bereits im oberen Dünndarm passiv, nicht ionogen, resorbiert werden können (6,72). Sulphatierte Gallensäurekonjugate werden nur sehr schlecht resorbiert (3,77). Die Resorption der nichtsulphatierten Gallensäurekonjugate ist dagegen sehr effektiv, so daß über 95% der biliären Gallensäuren über das Portalblut wieder zur Leber zurückgeführt werden. 5% der Gallensäuren treten in

das Kolon über, wo die primären in die sekundären Formen umgewandelt werden. Von diesen wird Desoxycholsäure zu ungefähr 50% resorbiert (36), die Lithocholsäure dagegen nur zu ungefähr 20% (22). Die effektivere Resorption von Chenodesoxycholsäure und die schlechten Resorptionsverhältnisse für sulphatierte Lithocholsäure im Dünndarm und für Lithocholsäure im Dickdarm erklären den geringen Anteil von Lithocholsäure in dem Gallensäurenpool (2%). Dagegen ist Desoxycholsäure mit 20 - 25% am Gesamtgallensäurenpool beteiligt.

Die nicht resorbierten Gallensäuren werden über den Stuhl ausgeschieden und stellen dadurch einen wichtigen Ausscheidungsweg für das Cholesterin dar. Die Ausscheidungsrate der Gallensäuren wird über die Neusynthese an primären Gallensäuren in der Leber ausgeglichen.

Eine Ausscheidung der Gallensäuren über die Nieren ist unter physiologischen Bedingungen vernachlässigbar klein. Der Grund für diese geringe renale Gallensäureausscheidung liegt unter anderem in der effektiven Aufnahme von Gallensäuren aus dem Portalblut durch die

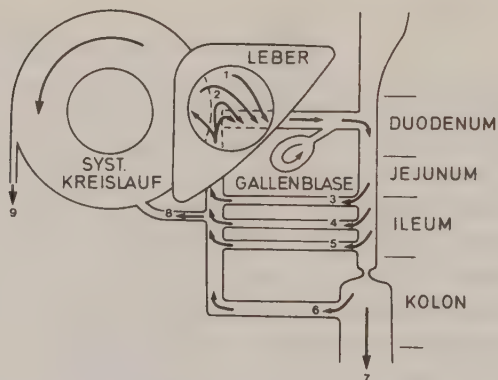


Abb. 4. Enterohepatischer Kreislauf der Gallensäuren. 1,2 Gallesekretion neu-synthetisierter und konjugierter Gallensäuren; 3,4,5 Resorption unkonjugierter Gallensäuren, Glyzin- und Taurinkonjugaten; 6 Resorption sekundärer Gallensäuren; 7 Fekale Exkretion; 8 Portosystemischer Shunting; 9 Renale Exkretion.

Leber. Hierbei werden die Cholsäurekonjugate effektiver als die Konjugate der Dihydroxygallensäuren behandelt. Aufnahmeraten zwischen 65 - 80% werden erreicht (63). Die Aufnahme von dekonjugierten Gallensäuren, die aus dem Kolon resorbiert werden, ist weniger effektiv: 40 - 55% (1,23,37,46,63). Die nicht von der Leber aufgenommenen Gallensäuren treten ins periphere Blut über und gelangen über den systemischen Kreislauf wieder an die Leber, so daß sie doch noch extrahiert werden können. Ein wichtiger Faktor für die Extrahierbarkeit der Gallensäuren ist das Ausmaß der Proteinbindung, welche für die einzelnen Gallensäuren und ihre Konjugatformen unterschiedliche ist (1,7,105).

Es wird angenommen, daß die Konzentration der Gallensäuren in der Leberzelle die Neusynthese über einen negativen Feedback-Mechanismus steuert (117). Hierbei soll der Effekt konjugierter Gallensäuren stärker als der Effekt unkonjugierter Gallensäuren sein (104). Dieser Zyklus von biliärer Sekretion und Resorption vollzieht sich 5 - 12mal pro Tag.

2.3.3. Störungen des enterohepatischen Kreislaufes

Verschiedene hepatobiliäre und gastrointestinale Erkrankungen führen zu einem gestörten Kreislauf der Gallensäuren. Hierbei kann man Störungen in der Synthese oder Extraktion der Gallensäuren durch chronische Lebererkrankungen (z.B. Leberzirrhose) (46,47,71,99, 126,130,138) oder cholestatische Syndrome intrahepatischer oder extrahepatischer Art (18,35,37,78) und Störungen in der Konservierung des Gallensäurenpool (Gallensäurenverlust) (59,64,94,101,107, 108,135) unterscheiden.

Andere Erkrankungen, die den Gallensäurenstoffwechsel beeinflussen, sind z.B. die bakterielle Überwucherung des Dünndarms, bei der vermehrt Gallensäuren dekonjugiert und möglicherweise dehydroxyliert werden (40,42,48,100,134), und die Colitis ulcerosa, bei der durch die erhöhte Passage im Dickdarm die Bildung sekundärer Gallensäuren vermindert ist (107,134).

Bei der Bildung cholesterinreicher Gallensteine dürfte eine Ver-

kleinerung des Gallensäurenpools eine Rolle spielen (95,115,137). Die Entfernung der Gallenblase (5,53,102,114) führt ebenso wie die endoskopische Papillotomie (113,127) zu Änderungen im Gallensäurenstoffwechsel. Änderungen im Gallensäurenmetabolismus werden auch bei der Behandlung der Cholelithiasis mit Chenodesoxycholsäure oder Ursodesoxycholsäure gefunden (24,96,109). Auch sind bei Hyperlipoproteinaemien Abweichungen im Gallensäurenmetabolismus gefunden worden (33,65). Hinweise auf einen gestörten Stoffwechsel von Gallensäuren können häufig mittels Bestimmungen der Gesamtgallensäurenspiegel oder vom Gallensäurenmuster in der Galle, im Serum oder im Stuhl gefunden werden.

Der Nachweis atypischer Gallensäuren in biologischen Proben (125, 133) erlaubt Rückschlüsse auf eine gestörte Synthese der Gallensäuren in der Leber oder auf einen atypischen bakteriellen metabolismus der Gallensäuren im Kolon. Das Ausmaß der Störung läßt sich mit Hilfe solcher Bestimmungen jedoch schlecht abschätzen, geeigneter ist die Bestimmung von Änderungen des Gallensäurenpools, der fraktionellen Umsatzrate, und der Syntheserate von Gallensäuren. Ein verkleinerter Pool der Gallensäuren hat Folgen für den Transport von Cholesterin und damit für die Bildung lithogener Galle und Gallensteinen. Ebenso sind für diesen Fall Störungen in der Fettverdauung und das Auftreten von Diarrhoen und Steatorrhoen beschrieben. Ein konstanter Gallensäurenverlust führt zu einer Steigerung der Synthese primärer Gallensäuren und wird diese möglicherweise überfordern. Eine erhöhte Umsatzrate von primären in sekundäre Gallensäuren kann zu einer erhöhten Konzentration sekundärer Gallensäuren im Kolon und damit möglicherweise zu einer Erhöhung des Risikos für die Entstehung des Kolonkarzinoms führen (55,68,141). Auch der Effekt von Diätfaktoren auf den Gallensäurenstoffwechsel in Hinblick auf ein erhöhtes Karzinomrisiko erfordert eingehendere Untersuchungen (56,61,62,68,88).

Die Kinetikparameter werden auch dann geändert sein, wenn die Zirkulationsrate der Gallensäuren innerhalb dem enterohepatischen Kreislauf sich ändert (29,31,54,86,89).

Von Interesse sind auch die Unterschiede im Gallensäurenstoffwechsel bei Frauen unter Einfluß oraler Anticonceptiva, bei Schwangeren

und Neugeborenen. So kann davon ausgegangen werden, daß die Gallensäurenkinetik während des Menstruationszyklus, besonders aber auch unter der Einnahme von Ovulationshemmern und im Verlaufe der Schwangerschaft Veränderungen unterworfen ist (69,123). Ebenso sind Änderungen im Gallensäurenstoffwechsel während der Entwicklung der Leberfunktion, des Gallengangssystems und des Intestinaltraktes in der Embryonalphase und im weiteren Verlauf des Lebens von Interesse (10,25,139,140).

Im nächsten Kapitel wird das kinetische Modell des enterohepatischen Kreislaufes vorgeführt und die Möglichkeiten zur Bestimmung der Poolgrößen, der fraktionellen Umsatzraten und der Syntheseraten besprochen.

3. GALLENSÄURENKINETIK

3.1. Kinetisches Modell

Innerhalb des enterohepatischen Kreislaufes kann man verschiedene Kompartimente unterscheiden, in denen sich Synthese-, Umwandlungs- oder Transportprozesse abspielen. Folgende Kompartimente lassen sich deutlich abgrenzen: die Leber (der Ort der Synthese und biliären Sekretion), die Gallenblase und der proximale Dünndarm (mechanische Pumpen mit Speicherkapazität) und das terminale Ileum (metabolische Pumpe ohne Speicherkapazität). Den Dickdarm, in dem sich die Synthese sekundärer Gallensäuren vollzieht und das Portalblut, in dem die Gallensäuren zur Leber transportiert werden, kann man als zusätzliche Kompartimente ansehen. Vereinfachend kann man den gesamten enterohepatischen Kreislauf aber auch als ein Gesamtkompartiment betrachten (Abb.5). Der Umsatz der primären Gallensäuren im enterohepatischen Kreislauf kann deshalb annähernd mit einem

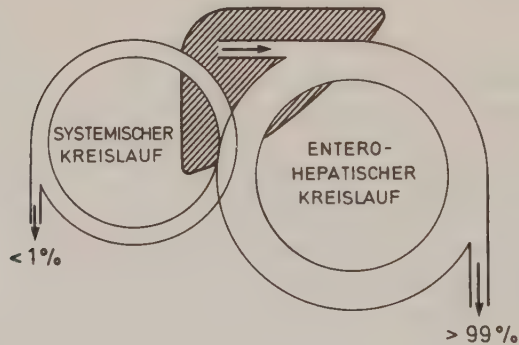


Abb. 5. Einkompartimentmodell des enterohepatischen Kreislaufes der Gallensäuren.

kinetischen Modell erster Ordnung beschrieben werden (75). Die Pools von Chenodesoxycholsäure und Cholsäure, die sich innerhalb der enterohepatischen Zirkulation befinden, sind unter physiologischen Bedingungen annähernd gleich groß. Die beschriebenen geringfügigen Unterschiede der Poolgrößen lassen sich durch unterschiedliche Synthese- und Resorptionsraten der beiden Substanzen erklären. So ist die Resorption von Cholsäurekonjugaten etwas schlechter, da sie weniger gut passiv resorbiert werden, was zu einem höheren fäkalen Verlust von Gallensäuren aus der "Cholsäurefamilie" führt.

Unter der fraktionellen Umsatzrate eines Pools versteht man den Teil der zirkulierenden Gallensäuren, der in 24 Stunden durch Neusynthese ersetzt wird. Dies wird in der Maßeinheit d^{-1} ausgedrückt. Die Poolgröße wird in mmol angegeben oder nach einem Vorschlag von Hofmann und Hoffman (60) auf das Körpergewicht bezogen ($\mu\text{mol kg}^{-1}$). Die Syntheserate berechnet sich als Produkt der fraktionellen Umsatzrate und des Pools und wird in mmol d^{-1} oder in $\mu\text{mol kg}^{-1} d^{-1}$ ausgedrückt.

3.2. Isotopenverdünnungsmethode

Eine direkte Methode zur Erfassung der Poolgröße einer Gallensäure wäre nur durch Entleerung des Pools durch eine komplette Galledrainage und Bestimmung der Konzentration der betreffenden Gallensäure möglich. Eine alternative Methode zur Bestimmung des Pools einer Substanz ist die sogenannte Isotopenverdünnungsmethode, wobei ein radioaktiv markiertes Homolog der Substanz in den Pool eingebracht wird. Nach ihrer Verteilung läßt sich aus der gefundenen spezifischen Markierung im Pool die Menge der endogenen Substanz berechnen.

1957 beschrieb Lindstedt zum ersten Male eine derartige Methode für Cholsäure (75). Hierzu verabreichte er freiwilligen Probanden oral 2-4 μCi $24\text{-}^{14}\text{C}$ Cholsäure und entnahm nach 25 Stunden 10ml Duodenalgalle nach Gallenblasenstimulation. Diese morgendliche Galleabnahme im nüchternen Zustand wurde an den folgenden 4 Tagen wiederholt. In den Galleproben wurde dann jeweils die spezifische Aktivität (SA) in $\text{dpm}/\mu\text{mol}$ Cholsäure nach säulenchromatographischer

Abtrennung dieser Substanz bestimmt. Der Verlauf dieser SA ist mit der Annahme eines kinetischen Modells erster Ordnung kompatibel. Dementsprechend nimmt der $\ln$ SA linear ab (Abb.6). Nach Interpolation bis zum Zeitpunkt der Dosierung kann aus dem Schnittpunkt mit der Y-Achse ($\ln SA_0$) der Cholsäurepool wie folgt berechnet werden:

$$\text{Poolgröße} = \frac{\text{Dosis}}{SA_0}$$

Der Abfall der spezifischen Aktivität mit der Zeit bringt zusätzlich Informationen über die fraktionelle Umsatzrate (= Steilheit der Kurve). Die gleiche Methode kann selbstverständlich für die Bestimmung der Kinetik der Chenodesoxycholsäure und der Desoxycholsäure verwendet werden, wobei für die Desoxycholsäure die Resorption neugebildeter Desoxycholsäure aus dem Darm das Ergebnis der Rechnung ist (60,61,62,141).

Die Lindstedtmethode zeigt aber leider einige Probleme, die die Anwendung dieser Technik beim Menschen wenig attraktiv machen. Hier ist zum einen die Verwendung radioaktiver Substanzen zu nennen. Obwohl die allgemein applizierten Dosen (2 - 10 μCi) unter den Sammel-

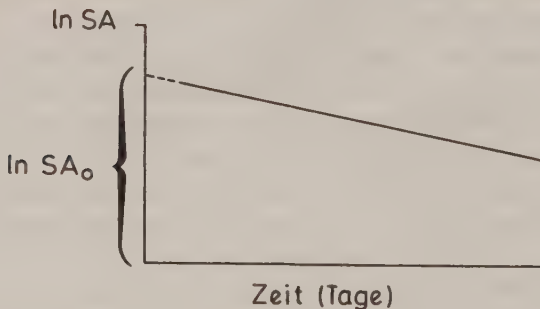


Abb. 6. Zeitabhängigkeit der spezifischen Aktivität nach Verabreichung radioaktiv markierter Gallensäuren.

begriff Spurendosen fallen, wird die Anwendung radioaktiver, mit ^{14}C markierten Tracersubstanzen zu Forschungszwecken immer umstritten bleiben. Darüberhinaus wird nicht nur in der BRD, sondern auch in den andern westeuropäischen Ländern wie auch in den USA die Anwendung von Radioaktivität zu Forschungszwecken immer stärker reguliert und eingeschränkt. Außerdem verbietet sich die Anwendung radioaktiver Substanzen bei Frauen im gebärfähigen Alter, Schwangeren, Neugeborenen und Kindern. Zum anderen ist die Gallesammlung eine hohe Belastung.

Da nur verhältnismäßig geringe Dosierungen an Aktivität verabreicht werden können, und wegen des geringen Übertritts von Gallensäuren in das periphere Blut, sind diesbezügliche Untersuchungen mittels Aktivitätsbestimmungen aus dem Serum nicht möglich. Um auf diese Weise zu sicheren Aussagen zu gelangen, müßten unverhältnismäßig hohe Dosen radioaktiver Substanzen verwendet werden.

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität kann deswegen nur in der Galle erfolgen. Hierzu muß bei der Versuchsperson entweder eine Verweilduodenalsonde gelegt werden, oder es wird fraktioniert über einen Zeitraum von 5 Tagen Duodenalgalle gewonnen. Die Positionierung der Sonde erfolgt dabei unter endoskopischer oder röntgenologischer Kontrolle. Diese Verfahrensweisen stellen in jedem Fall eine hohe Belastung für den Patienten dar, was nicht nur die Motivierung der Patienten zu dieser Diagnostik, sondern auch die von gesunden Probanden zur Beteiligung an wissenschaftlichen Studien sehr erschwert. Darüberhinaus sind Galleabnahmen über die Duodenalsonde mühsam. Andere Nachteile dieser Technik liegen in einer Displazierung der Sonde, Erbrechen oder zu frühe Gallenblasenentleerung. Selbst bei einer genauen Plazierung der Sonde im Duodenum vor der Papilla Vateri gelingt nur die Abnahme mehr oder weniger mit Pankreas- und Darmsekret verdünnter Duodenalgalle. Speziell für den Fall der Gallegewinnung über eine Verweilsonde sind unphysiologische Zustände, die das Ergebnis verfälschen, zu erwarten. Die Stimulierung der Gallenblasenkontraktion wird von allen Autoren mit Hilfe von Cholecystokinin im nüchternen Zustand durchgeführt. Die dadurch provozierte Gallesekretion in das Dünndarlumen ohne die gleichzeitige Anwesenheit von Speisebrei bewirkt unphysiologische Bedingungen für die Resorption der Gallensäuren. Die i.v.-App-

likation von cholecystokinin ist auch nicht immer unproblematisch, da nach Verabreichung häufig Durchfälle oder Erbrechen beobachtet werden.

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von Cholsäure oder Chenodesoxycholsäure müssen verschiedene analytische Techniken kombiniert werden. So ist eine säulen- oder dünnschichtchromatographische Trennung der Aktivität der primären Gallensäuren und ihrer Metaboliten notwendig. Probleme können sich bei der quantitativen Entfernung der individuellen Gallensäuren von der Dünnschichtplatte ergeben. Im Anschluß daran wird die Aktivitätszählung mit Hilfe eines Scintillationszählgerätes in den verschiedenen Dünnschichtfraktionen ausgeführt, dann findet eine chemische Quantifizierung von Cholsäure und/oder Chenodesoxycholsäure in denselben Fraktionen statt, wobei man sich enzymatischer oder gaschromatographischer Bestimmungsverfahren bedient. Jede dieser drei Techniken (Trennverfahren, Scintillationszählung und chemische Quantifizierung) hat ihre eigene Fehlergröße, die große Streuungen bedingen kann. Außerdem werden die markierte Substanz und die unmarkierte Substanz mit völlig unterschiedlichen Methoden gemessen. Verkürzungen der Methoden zur Poolbestimmung zu Einpunkt- oder Zweipunktmethoden sind beschrieben worden, aber sind trotz guter Übereinstimmung mit der Lindstedt-Methode noch nicht voll akzeptiert (30,103,136).

3.2.1. Einsatz stabiler Isotope

Die Nachteile, die mit der Dosierung radioaktiver Isotopen verbunden sind, können dann vermieden werden, wenn die radioaktiven durch stabile Isotopen ersetzt werden. So können anstelle von $24\text{-}^{14}\text{C}$ - Gallensäuren $24\text{-}^{13}\text{C}$ - Gallensäuren, und statt ^3H -markierten ^2H -markierte Gallensäuren verwendet werden. Die Bestimmung solcher Isotopen kann aber nicht mehr mittels Scintillationszählungen durchgeführt werden, statt dessen ist man hier auf eine Kombination von Gaschromatographie und Massenspektrometrie angewiesen. Es waren Peter Klein und Mitarbeiter, die in klinischer Zusammenarbeit mit Alan Hofmann und anderen Klinikern eine Methode zur ^{13}C - Isotopenmessung von Gallen-

säuren entwickelt haben (70). In Galleproben, die nach oraler Verabreichung von 50mg ^{13}C -markierten Gallensäuren gewonnen wurden, wurden zunächst die Gallensäurenkonjugate dekonjugiert und die freien Säuren zu flüchtigen Substanzen derivatisiert. Diese Derivate wurden gaschromatographisch aufgetrennt und die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse dann mittels Massenspektrometrie bestimmt. Zwar war es ein wesentlicher analytischer Vorteil dieser Methode, daß jetzt die markierte wie auch die unmarkierte Substanz mit derselben Methode gemessen wurden, die Nachteile der Gallegewinnung waren aber noch nicht beseitigt. Die Dosierung der markierten Substanzen wird einerseits durch die untere Meßgrenze der Methodik bestimmt, andererseits durch die zu erwartende Hemmung der Gallensäuresynthese beim Überschreiten einer gewissen Dosis. Hierbei die Grenze festzulegen ist schwierig. Im allgemeinen soll durch die Verabreichung der markierten Substanz der Pool um nicht mehr als 10% erhöht werden. Bei normalen Probanden betragen die Pools von Cholsäure sowie von Chenodesoxycholsäure durchschnittlich 1g, so daß eine Dosis von 50mg markierter Substanz vertretbar erscheint. Die Probleme im Zusammenhang mit den Galleabnahmen ließen sich dann umgehen, gelänge es, die Kinetikmessungen im Serum, statt wie bisher in der Galle durchzuführen. Dies hat sich aber bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt aus verschiedenen Gründen noch nicht verwirklichen lassen. Zum einen ist die Konzentration der Gallensäuren im Serum um den Faktor 10 000 niedriger als in der Galle, zum anderen befinden die Gallensäuren im Serum sich in einem viel komplizierteren biologischen Milieu, verursacht durch strukturähnliche Substanzen wie z.B. das Cholesterin, das hier in ungefähr 1000mal höheren Konzentrationen, bezogen auf die Gesamtgallensäuren, vorliegt. Erst in den letzten Jahren haben Entwicklungen in der Kapillargaschromatographie, in der Massenspektrometrie und auf dem Gebiet der Extraktionsmethoden die notwendigen Voraussetzungen geschaffen, diese Methode zu etablieren.

3.3. Ziele der Studie

Um alle Probleme, die mit der Verabreichung radioaktiver Gallensäuren und mit der Sammlung von Gallenproben zusammenhängen, zu

vermeiden, ist es Ziel der vorliegenden Arbeit, eine Methode zur Messung des Pools und der Syntheserate der primären Gallensäuren mittels stabil markierter Gallensäuren und ihrer Messung im Serum vorzustellen. Die beschriebene Methode soll in allen Fällen, in denen die Messung der Kinetik in der Galle ihre Wertigkeit schon bewiesen hat, anwendbar sein, d.h. nicht nur bei Normalpersonen, sondern auch bei Patienten mit hepatobiliären Störungen. Voraussetzung ist allerdings, daß die Gallensäurenkinetik auch im Serum durch ein Einkompartimentmodell beschrieben werden kann. Die neue Methode soll gleichzeitig für die Bestimmung der kinetischen Parameter von Chenodesoxycholsäure und Cholsäure verwendbar sein. Zur Entwicklung dieser Methode werden analytische Überlegungen im Hinblick auf die Vorbereitung der Serumproben, besonders auf die Extraktionsmöglichkeiten für Gallensäuren, die gaschromatographische Auftrennung und die massenspektrometrische Fragmentierung der Gallensäuren angestellt, da diese Aspekte die Grundlagen für die Messung der Isotopenverhältnisse und damit für die Bestimmung der Abklingquote der dosierten ^{13}C - Markierung bilden. Im Anschluß daran wird die Anwendung der neu entwickelten Methode zur Bestimmung der Poolgrößen und Syntheseraten von Normalpersonen beschrieben. Die Validität der Serummethode wird mittels gleichzeitiger Bestimmung der Gallensäurenkinetik in der Galle belegt.

4. MESSUNG DES ISOTOPENVERHÄLTNISSSES VON GALLENSÄUREN

4.1. Physikalische Grundlagen

Bekanntlich kommen viele Elemente als Mischung zweier oder mehrerer Isotopen vor, die sich nur durch eine unterschiedliche Anzahl von Neutronen im Atomkern unterscheiden. Die Anzahl der Protonen und der den Kern umgebenden Elektronen ist für jedes Isotop gleich. Abgesehen von vernachlässigbaren Unterschieden in chemischen und physikalischen Eigenschaften ist das Atomgewicht der einzig meßbare Unterschied zwischen den Isotopen. Tabelle I zeigt die am häufigsten vorkommenden Isotopen mit ihren relativen Erscheinungshäufigkeiten (das am häufigsten vorkommende Isotop = 100%).

Ein Molekül ist aus mehreren Atomen zusammengestellt und enthält dadurch eine Mischung von Isotopen, die sich wiederum aus Kombinationen von Isotopen der individuellen Atome zusammensetzt. So wird ein organisches Molekül $C_xH_yO_z$ hauptsächlich aus den Isotopen ^{12}C , ^{13}C , H, ^2H , ^{16}O und ^{17}O aufgebaut sein, wobei ^{13}C , ^2H und ^{17}O das Molekulargewicht (M) mit einer Masseneinheit erhöhen (M+1). Das Verhältnis zwischen den beiden Isotopen M und M+1 kann auf folgende Weise berechnet werden: $(M+1)/M = 1.08x + 0.016y + 0.04z \%$.

Die Einführung einer stabilen Markierung in ein organisches Molekül erhöht den M+1- Isotopenanteil über das natürliche Verhältnis hinaus. Zur Bestimmung dieses Isotopenanteils ist es notwendig, die Isotope mittels ihrer Massen zu trennen. Dies geschieht mit Hilfe eines Massenspektrometers. Der Markierungsgrad errechnet sich aus dem Unterschied zwischen diesem Isotopenanteil und demjenigen der unmarkierten Substanz.

4.2. Isotopenverhältnismessungen an Gallensäuren

Die Messung von Isotopenverhältnissen an den primären Gallensäuren im Serum erfordert die folgenden Überlegungen:

1. Die Konzentration von Gallensäuren im peripheren Blut ist sehr gering

Exact Masses of Nuclides

Element	Atomic weight	Nuclide	Nominal Mass	Exact Mass	Natural abundance (%)
Hydrogen	1.00797	H	1	1.00783	100
		D (H ²)	2	2.01410	0.016
Carbon	12.01115	C	12	12.00000	100
		C ¹³	13	13.00336	1.08
Nitrogen	14.0067	N	14	14.0031	100
		N ¹⁵	15	15.0001	0.36
Oxygen	15.9994	O	16	15.9949	100
		O ¹⁷	17	16.9991	0.04
Fluorine	18.9984	O ¹⁸	18	17.9992	0.20
		F	19	18.9984	100
Silicon	28.086	Si	28	27.9769	100
		Si ²⁹	29	28.9765	5.07
Phosphorus	30.974	Si ³⁰	30	29.9738	3.31
		P	31	30.9738	100
Sulfur	32.064	S	32	31.9721	100
		S ³³	33	32.9715	0.78
Chlorine	35.453	S ³⁴	34	33.9679	4.39
		Cl ³⁵	35	34.9689	100
Bromine	79.909	Cl ³⁷	37	36.9659	32.7
		Br ⁷⁹	79	78.9183	100
Iodine	126.904	Br ⁸¹	81	80.9163	97.5
		I	127	126.9045	100

Tab I. Natürlich vorkommende Isotope und ihre relativen Erscheinungshäufigkeiten.

2. Im Serum befinden sich auch die sekundären Gallensäuren, die die Markierung ihrer Ausgangsprodukte tragen
3. Der Wunsch, die Messungen an Cholsäure und Chenodesoxycholsäure gleichzeitig durchzuführen.

Diese Bedingungen erfordern eine empfindliche Methode, die zusätzlich zur Isotopentrennung eine Trennung von primären und sekundären, sowie der beiden primären Gallensäuren voneinander ermöglicht. Diesen Anforderungen entspricht eine Kombination von Gaschromatographie und Massenspektrometrie. Allerdings müssen die Gallensäuren zuerst aus dem Serum extrahiert und die Proben für diese Bestimmungsmethode besonders vorbereitet werden. Da die konjugierten und sulphatierten Gallensäuren eine hohe Polarität haben, müssen diese desulphatiert und dekonjugiert werden. Außerdem erfordert die Gaschromatographie eine Derivatisierungstechnik, um die Gallensäuren in flüchtige Verbindungen umzuwandeln.

4.2.1. Isolierung der Gallensäuren aus biologischem Material

Wegen der hohen Konzentration an Gallensäuren in der Galle (bis $100\mu\text{mol/ml}$) und den relativ geringen Mengen störender Substanzen kann die Galle ohne weitere Extraktion verarbeitet werden. Im Serum gesunder Personen beträgt die Konzentration der Gallensäuren nüchtern dagegen nur bis $10\mu\text{mol/l}$ und postprandial bis $20\mu\text{mol/l}$. Die Konzentrationen der primären Gallensäuren sind davon nur ein Teil, wobei die Cholsäurekonzentration einen Wert von $1\mu\text{mol/l}$ kaum überschreitet. Zusätzlich wird wegen der Proteinbindung der Gallensäuren eine besondere Extraktionstechnik nötig. Flüssig-flüssig-Extraktion ist aufgrund der Anwesenheit dieser Proteine und anderer biologisch aktiver Substanzen schwierig. Eine Vereinfachung und Verbesserung der Abtrennung von Gallensäuren haben die Absorptionsharze XAD-2, XAD-4 und XAD-7 (14,82) gebracht, mit denen die Gallensäuren sowohl über ein Säulenverfahren als auch über ein Batchverfahren extrahiert werden können. Eine weitere Verbesserung hinsichtlich der Selektivität wie auch der Verfahrensvereinfachung bedeutete die Einführung der reversed Phase C_{18} -Kartuschen (21,27,120,121). Unter Einsatz dieser Technik sind Wiederfindungen von über 90% für sowohl die freien Säuren als auch für die konjugierten und sulphatierten Gallensäuren gefunden worden. Die Absorptionskapazität der

Kartuschen ist hoch und die Elutionsgeschwindigkeit weniger kritisch als bei den XAD-Säulen. Die störende Proteinbindung der Gallensäuren wird durch starkes Alkalisieren (pH über 10) des verdünnten Serums und Erhitzen auf 64°C aufgespalten (119). Die Proteine werden nicht an die C₁₈-Kartuschen gebunden.

4.2.2. Desulphatierung und Dekonjugation

Die Entdeckung, daß die Gallensäuren im Serum, vor allem aber im Urin, zu einem wesentlichen Teil als Sulphatester vorliegen (97), führte zu einer allgemein verwendeten Methode zur Abspaltung dieser Sulphatgruppen (98). Diese Technik basiert darauf, daß die S-O - - Bindung nur in wässriger Lösung bei höherem pH stabil ist und bei einem Wechsel zu einer weniger polaren, organischen, wasserfreien Lösung die R-OSO₃⁻- Gruppe im saurem Milieu in eine Hydroxylgruppe umgewandelt wird. Nach Palmer und Bolt wird hierzu eine Mischung von 0,1N HCL in Methanol und Aceton (1:9 v/v) benutzt. Ali und Javitt führten 1970 unter Benutzung von 2,2-Dimethoxypropan (DMP) eine alternative Methode ein (2). Eine direkte Zugabe von DMP zu angesäuertem Serum (7:1, v/v) verursacht Proteinausfall, nachdem DMP mit Wasser unter Bildung einer Mischung von Methanol und Aceton reagiert hat.

Die Abspaltung der Glyzin- und Taurinkonjugatgruppen geschah ursprünglich unter Verwendung von 1-2N Natronlauge, mit oder ohne Zugabe von Methanol oder Ethanol, bei 110 - 120°C (111). Die Artefaktbildung und/oder Destruktion von Oxogallensäuren (NaOH ohne Alkohol) oder Hydroxylierung von Oxogallensäuren (NaOH mit Alkohol) unter diesen extremen Bedingungen machen diese Methode sehr anfällig. Die Einführung der enzymatischen Abspaltung der Aminosäureanteile der Gallensäuren machte die Hydrolysebedingungen milder. Hierbei wird die Cholylglyzinhydrolase benutzt (93), ein Enzym, das bei einem pH-Wert von 5,6 bei 37°C optimale Aktivität zeigt. Die nicht sulphatierten Hydroxygallensäuren werden schon innerhalb kurzer Zeit dekonjugiert, Oxogallensäuren erfordern dagegen mehrere Stunden.

4.2.3. Extraktion und Derivatisierung der dekonjugierten Gallensäuren

Da die Dekonjugation in wässriger Lösung durchgeführt wird, ist eine zweite Extraktion der Gallensäuren in einer organischen Phase notwendig. Ursprünglich wurde die wässrige Lösung bis pH 1 angesäuert und die dekonjugierten Gallensäuren mit Diäthyläther ausgeschüttelt. In neueren Verfahren wird diese Flüssig-flüssig-Extraktion durch eine Säulenextraktion über C_{18} -Kartuschen oder über Lipidex 1000, ein lipophiles Gel, das sich besonders für die selektive Extraktion unkonjugierter Gallensäuren eignet, ersetzt (119). Wie schon unter 4.2 aufgeführt wurde, erfordert die gaschromatographische Trennung eine vorherige Derivatisierung der Gallensäuren zu flüchtigen Substanzen. Dazu müssen die polaren funktionellen Karboxylgruppen und Hydroxylgruppen in weniger polare Derivate umgewandelt werden. Zu diesem Zweck wird die Karboxylgruppe von fast allen Forschungsgruppen über eine Methylierungsreaktion verestert. Diese Methylierung erfolgt zumeist mit frisch synthetisiertem Diazomethan (118). Eine einfachere, weniger gefährliche, aber ebenso gute Methode stellt die Benutzung von Methanol dar, wobei nach Ansäuern der Lösung auf pH 1 2,2 Dimethoxypropan als Wasserentziehungsmittel verwendet wird (2). Für die Derivatisierung der Hydroxylgruppen werden verschiedene Verfahren angegeben. Im allgemeinen haben sich aber drei Methoden im Laufe der Jahre bewährt, und zwar die Bildung von Trimethylsilyläther (TMS)-, Acetatester-, und Trifluoroacetat (TFA)-Derivaten (14,19,106), obwohl die Verwendung anderer Derivate beschrieben wurde (11,32,52,85). In der im Folgenden beschriebenen Methode werden die TMS-Derivate verwendet, die mittels einer Mischung von Trimethylchlorsilan (TMCS) und Hexamethyldisilan (HMDS) in Pyridin (1:2:3 v/v) gebildet werden, wobei dem Pyridin die Rolle eines Katalysators dieser Reaktion zugeschrieben wird.

4.3. Gaschromatographische Trennung der Gallensäureenderivate

4.3.1. Das Prinzip der Gaschromatographie

Durch die Gaschromatographie wird eine Substanz durch eine selektive Verteilung in einer gasförmigen mobilen Phase und einer flüssigen oder festen stationären Phase von anderen Substanzen in einer Mischung getrennt. Diese Trennung findet über eine Säule, die verschieden aufgebaut sein kann, statt. Es gibt die gepackten Säulen, bei denen die stationäre Phase auf einem porösen Trägermaterial fixiert ist, welches in ein Glasrohr mit einem Innendurchmesser von 1 - 5mm und einer Länge von 1 - 5m gepackt wird. Als mobile Phase wird ein inertes Gas wie Stickstoff oder Helium mit einer Flußgeschwindigkeit von 10 - 20ml/min verwendet. Zur Trennung der Substanzen wird die Säule auf eine gewünschte Temperatur erhitzt. Die gepackten Säulen sind aber zunehmend durch sogenannte Kapillarsäulen (49) ersetzt worden, deren Vorteil eine wesentlich höhere Trennleistung und höhere Empfindlichkeit sind. Bei diesen Kapillarsäulen ist die flüssige stationäre Phase in einer weniger als 1µm dünnen Schicht auf der Innenseite einer Glas- oder Quarzsäule (76) mit einem Innendurchmesser von 0.25 - 0.50mm und einer Länge von 10 - 50m aufgebracht. Auch hier werden Stickstoff und Helium, aber bevorzugt Wasserstoff als Trägergas (mobile Phase) benutzt. Die Durchflußgeschwindigkeit liegt mit 2 - 5ml/min niedriger als bei der Verwendung gepackter Säulen. Die Art der Beschichtung ist für beide Säulentypen vom Prinzip her gleich und wird nach ihrer Polarität klassifiziert. So gibt es eine Reihe von kommerziellen stationären Phasen mit Polaritäten von sehr wenig polar (SE-30, OV-1) über mittelpolar (OV-17, SP 2250) bis hochpolar (Carbowax 20M). Die Trennung zweier Substanzen wird bei der Gaschromatographie von mehreren Faktoren bestimmt, wie der Art der Beschichtung, der Schichtdicke, dem Durchmesser und der Länge der Säule, der Trägergasgeschwindigkeit und der Temperatur.

4.3.2. Die kapillargaschromatographische Trennung von Gallensäuren-Methyl-TMS-Derivaten

Die TMS-Derivate der Gallensäuren-Methylester lassen sich prinzipiell durch alle oben genannten stationären Phasen kapillarchromatographisch trennen. So sind Trennungen mit Hilfe der folgenden Phasen beschrieben worden: Carbowax 20M (66,67), OV-101 (74), OV-1 (119). Folgende allgemeine Regeln kommen für die Trennung in Betracht: Je geringer die polaren Eigenschaften der Säule, um so länger ist die Retentionszeit bei abnehmender Selektivität. Die Verwendung von Säulen mit stark polaren Eigenschaften dagegen erlaubt eine gute Trennung der Hydroxygallensäuren bei kurzen Retentionszeiten, jedoch wird dadurch eine starke Diskriminierung der Oxogallensäuren herbeigeführt, da diese erst bei langen Retentionszeiten eluieren.

Andere Faktoren bei der Wahl der stationären Phase sind die Temperaturstabilität und die Empfindlichkeit gegenüber Spuren von Wasser und Sauerstoff, die trotz Filterung des Trägergases noch in die Säule eindringen oder während der Lagerung der Säule deren Beschichtung beeinflussen können. Gegen diese Einflüsse sind polare stationäre Phasen wie Carbowax 20M sehr empfindlich und daher weniger empfehlenswert.

Isotopenverhältnismessungen erfolgen mittels massenspektrometrischer Detektion. Hierbei ist es wichtig, daß interessierende Gallensäuren nicht nur von anderen biologischen Substanzen, sondern auch von anderen Gallensäuren mit den gleichen massenspektrometrischen Eigenschaften getrennt werden. Die gaschromatischen Peaks der einzelnen Dihydroxygallensäuren und Trihydroxygallensäuren dürfen sich im allgemeinen nicht überlappen. Eine Überlappung zwischen Di- und Trihydroxygallensäuren ist nur unter bestimmten Verhältnissen gestattet. Es ist auch wichtig, darauf zu achten, daß unter bestimmten pathologischen Bedingungen atypische Gallensäuren gebildet werden können, die den primären Gallensäuren sehr ähnliche massenspektrometrische Eigenschaften aufweisen. Auch diese dürfen gaschromatographisch nicht überlappen.

Wegen der oben genannten Nachteile der hochpolaren und apolaren

Säulenbeschichtungen wurde eine mittelpolare OV-1701 Säule gewählt, die neben einer ausreichenden Selektivität auch eine hohe Thermostabilität hat.

4.3.3. Injektionstechniken

Es sind verschiedene Injektionstechniken entwickelt worden, die dazu dienen, die Mischung der zu trennenden Substanzen in die gasförmige mobile Phase einzubringen. Die Mischung wird zu diesem Zweck in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst, und ein Aliquot mit einer speziellen Spritze injiziert. Die geringsten Probleme hinsichtlich der Injektion ergeben sich bei der Verwendung gepackter Säulen, da die Probe nach Durchstechen eines Septums direkt auf die Säule aufgebracht werden kann. Bei dieser Methode sind Injektionsvolumen bis 4 - 5 μ l möglich. Kapillarsäulen erlauben nur die Injektion geringerer Mengen Lösungsmittel, wobei die zulässige Menge mit abnehmendem Durchmesser der Säule immer geringer wird. Die Injektionsmenge beträgt bei einem Säulendurchmesser von 0,3mm maximal 2 μ l. Mit Hilfe des Splitverfahrens wird jeweils nur ein bestimmter Teil der injizierten Menge in die Säule eingebracht. Diese Methode ist aber nur dann praktikabel, wenn hohe Konzentrationen flüchtiger Substanzen vorhanden sind. Für Spurenmengen biologischer, wenig flüchtiger Substanzen eignen sich nur Methoden, die es erlauben, relativ große Mengen dieser Substanzen direkt in die Säule zu injizieren. Dies geschieht mit Hilfe eines Solidinjektors (13) oder eines On-columninjektors (49). Beide Methoden erlauben die Injektion in eine Säule mit einem Innendurchmesser von 0,3 - 0,5mm.

4.4. Massenspektrometrie der Gallensäuren-Methyl-TMS-Derivate

4.4.1. Prinzip der Massenspektrometrie

In der Ionenquelle eines Massenspektrometers werden die Moleküle einer Substanz unter weiterer Energieübertragung durch die Ab-

spaltung von nicht geladenen Molekülen in mehrere Fragmente zerlegt. Dieser Ionisierungs- und Fragmentierungsprozeß läuft unter der Einwirkung von Elektronen ab, die von einem hoch erhitzten Filament ausgestrahlt werden. Um eine wirkungsvolle Fragmentation zu gewährleisten, wird die Ionisierungskammer des Massenspektrometers bis zu 10^{-6} - 10^{-7} Torr evakuiert. Die entstandenen Molekülonen und Fragmente werden mittels eines elektrischen oder elektromagnetischen Massenfilters separat in einem Elektronenmultiplier aufgefangen, wodurch das Signal verstärkt wird. In moderneren Geräten wird das Signal einem Computer zugeführt, der die eingegangenen Daten speichert und verarbeitet. Das Fragmentierungsmuster ist sehr spezifisch für jede Substanz und hängt von der Stärke der Atombindungen innerhalb des Moleküls ab. In den meisten Fällen sind auch Stereoisomere durch ihr Fragmentierungsmuster zu unterscheiden. Dabei kann die Fragmentierung prinzipiell durch zwei Methoden geschehen: Zum einen durch direkte Bombardierung des Moleküls mit Elektronen, d.h. Elektronenstoßionisierung (Electron Impact, EI), zum anderen kann ein geeignetes Gas in die Ionenquelle geleitet werden, wodurch die Energieübertragung verringert und so der Grad der Fragmentierung herabgesetzt wird (chemische Ionisation; chemical ionisation, CI) (91).

Die zu analysierenden Substanzen können auf zwei Arten in die Ionenquelle eingeführt werden. Über ein Direkteinlaß-System kann die Probe mit einer Schubstange in die Quelle vorgeschoben werden. Diese Methode kann aber nur in Fällen benutzt werden, in denen Strukturanalysen an Reinsubstanzen vorgenommen werden oder wenn eine Substanz mit einem sehr spezifischen Fragmentierungsmuster nachgewiesen werden soll. Für biologische Proben ist jedoch meistens eine Vortrennung notwendig, die über die Gaschromatographie oder die Hochflüssigkeitschromatographie erfolgen kann. Die letzte genannte Methode ist leider noch in Entwicklung (80). Eine Gaschromatographiesäule wird mit der Ionenquelle des Massenspektrometers verbunden. Gepackte Säulen erfordern wegen des großen Trägergasflusses einen Separator zur Abtrennung des Trägergases, Kapillarsäulen dagegen können durch eine verlängerte Kapillare direkt in die Ionenquelle gebracht werden.

Die Ionen, die beim Ionisierungs- und Fragmentierungsprozeß entstehen, werden mittels eines elektronischen Linsensystems zentriert und in den sogenannten Analysatorteil eingeleitet. Diesen passieren die Ionen aufgrund ihrer Masse getrennt, dabei bestimmt die Anzahl der Ionen mit gleicher Masse die Intensität des Signals. Die Trennung der Ionen findet elektromagnetisch (in einem Magnetsektorgerät) oder elektrisch (in einem Quadrupolgerät) statt. Die getrennten Ionen werden auf der sensiblen Schicht eines Elektronenmultipliers aufgefangen und setzen aus dieser nach dem Schneeballprinzip weitere Elektronen frei. Dieses verstärkte Signal wird dann einem Computer zugeführt, der die Signalintensitäten den Massen der Fragmente zuordnet.

4.4.2. Das Massenspektrum

Die Zeit, die gebraucht wird, um alle Intensitäten der Fragmentionen und Molekülionen zu registrieren, wird allgemein die Scanzeit genannt. Diese Scanzeit hängt von vielen Faktoren ab und kann vorgewählt werden. Übliche Scanzeiten variieren zwischen Zeiten unter einer Sekunde bis zu 10 Sekunden. Normiert man die höchste Intensität, die in einem Scan gemessen wird, auf 100% und trägt man die Intensität gegen die Masse der Ionen auf, erhält man das sogenannte Massenspektrum (Abb.7). Dieses Massenspektrum stellt das Fragmentierungsmuster einer Substanz dar. Darüberhinaus stellt ein gut aufgenommenes Spektrum auch das Isotopenmuster dar. Dazu wird jedes Fragment als eine Gruppe von zwei oder mehr Strichen angegeben mit jeweils einer Masseneinheit Unterschied.

4.4.3. Selected Ion Monitoring (SIM)

Obwohl in verschiedenen Verhältnissen, können Massenspektren von unterschiedlichen Substanzen Fragmente mit den gleichen Massen zeigen. Es finden sich aber auch oft sehr charakteristische Ionen, die man dann zur spezifischen Identifizierung einer Substanz benutzen kann. Solche Ionen können ausgewählt werden, um eine derartige Sub-

stanz zu erfassen. Um dies zu gewährleisten, werden während des Gaschromatographielaufes nur die spezifischen Fragmente dieser Substanz detektiert und aufgezeichnet. Ein derartiges Chromatogramm, in dem nur eine oder sehr wenige Substanzen selektiv detektiert werden, nennt man ein Massenchromatogramm (Abb.8).

4.4.4. Isotopenverhältnismessungen

Obwohl eine Isotopentrennung auch im normalen Scanverfahren beobachtet wird, eignet sich dieses Verfahren nicht für reproduzierbare Isotopenverhältnismessungen. Erhebliche Verbesserungen erzielt man durch SIM, da man die Meßzeit für jedes Fragment und dessen Isotopie vorwählen kann. Hierbei können die verschiedenen Isotopen durch Massenchromatogramme separat aufgezeichnet werden (Abb.9). Zur Bestimmung des Isotopenverhältnisses wird der Background unter den Peaks subtrahiert und das mittlere Verhältnis der Isotopenanteile über alle Scans, die auf dem chromatographischen Peak gesammelt wurden, bestimmt. Dabei muß gefordert werden, daß die Peakform annähernd symmetrisch ist, und daß eine ausreichende Anzahl

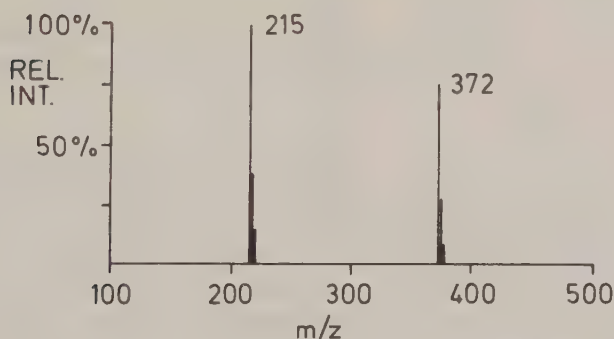


Abb. 7. Massenspektrum einer Substanz "X"

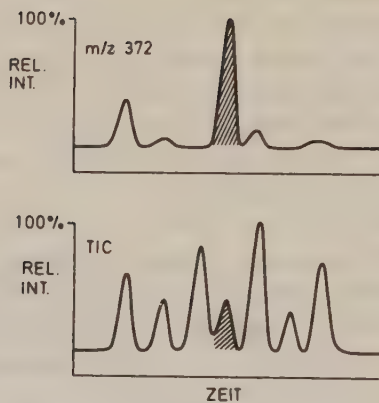


Abb. 8. Selektive Detektion der Substanz "X" in einer Mischung mehrerer Substanzen mittels Massenchromatographie.

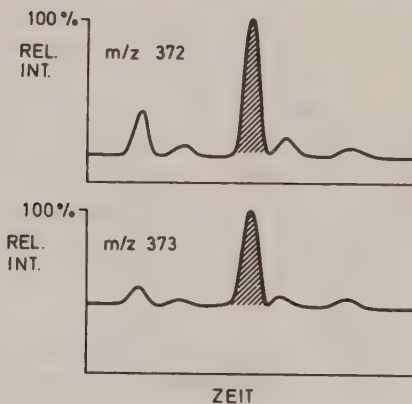


Abb. 9. Isotopentrennung für Substanz "X" mittels Selected Ion Monitoring.

von Scans auf dem gaschromatographischen Peak gesammelt werden kann. Asymmetrische Peakformen werden bei sehr niedrigen Konzentrationen gefunden, wobei die Peakform zerstört wird und bei hohen Konzentrationen, wenn die kapillarchromatographische Säule überladen wird und dadurch Tailing verursacht.

Minimal sollten 20 Scans, d.h. 20 Meßpunkte pro Substanz gesammelt werden. Um dieses Ziel zu erreichen, müssen die chromatographischen Bedingungen, die die Peakbreite bestimmen, und die Scangeschwindigkeit aneinander angepaßt werden.

4.4.5. Fragmentierung der Gallensäuren-Methyl-TMS-Derivate

4.4.5.1. Elektronenstoßionisierung

Die Fragmentierung der Gallensäuren verläuft hauptsächlich unter Abspaltung von $(\text{CH}_3)_3\text{SiOH}$ -Molekülen aus dem Molekularion (M^+). Hierbei entstehen Ionen mit den Massen $\text{M}-90$, $\text{M}-2 \times 90$ und $\text{M}-3 \times 90$. Anschließend wird aus diesen Fragmenten die Seitenkette zu unterschiedlichen Graden abgespalten (Massenunterschied 115). Hierdurch können die Massenspektren wie in Abb.10 erhalten werden. Die Fragmentierung besonderer Gallensäuren als Konjugate, freie Säuren, Methylester oder unterschiedliche Derivate wurde von Elliott (34) und Sjövall (124) ausführlich beschrieben.

4.4.5.2. Chemische Ionisierung

Wie in 4.4.1 erwähnt wurde, wird bei diesem Prozeß die Fragmentierung durch Gasmoleküle, die in die Ionenquelle eingeführt werden, gehemmt. Diese sorgen für die Übertragung der Elektronenenergie. Die üblichen sogenannten Reaktionsgase sind Methan (92), Isobutan (132) und Ammoniak (26,73). Jedes Reaktionsgas beeinflusst das Massenspektrum in eigener Weise, aber in allen Fällen erhalten die Fragmentionen im höheren Massebereich relativ mehr Intensität. Ob damit auch eine absolute Empfindlichkeitssteigerung im Vergleich zum EI-Verfahren erreicht wird, ist vom verwendeten Derivat abhän-

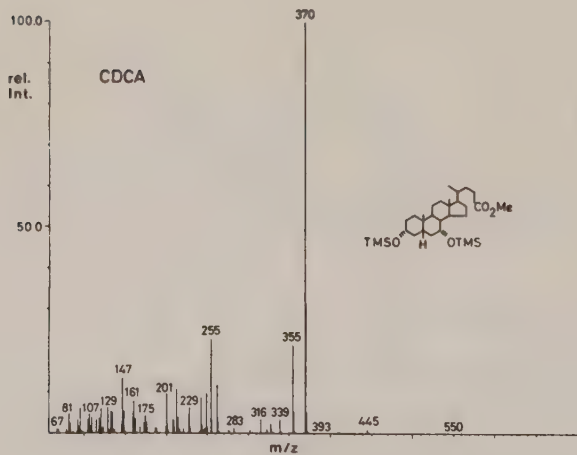
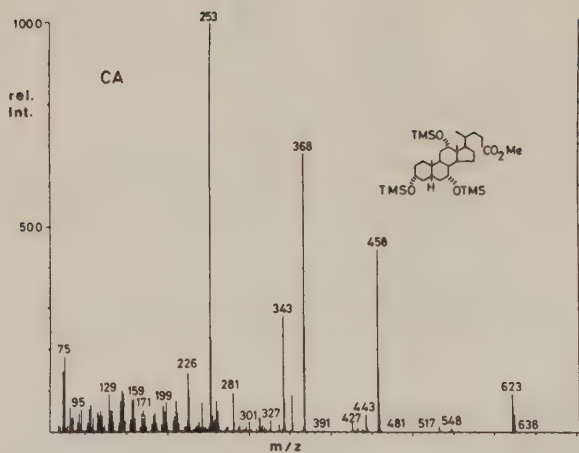


Abb. 10. Massenspektren der Methylester-TMS-Derivate von Cholsäure (CA) und Chenodesoxycholsäure (CDCA).

gig. Im Gegensatz zu Beobachtungen mit Methyl-Acetat-Derivaten (26,73) bringen die verschiedenen CI-Verfahren keine Empfindlichkeitssteigerung für Methyl-TMS-Derivate, wie sich in eigenen Vorversuchen herausstellte. Da bei der CI (insbesondere bei der Ammoniak-CI) viel stärkere und schnellere Ionenquelleverschmutzungen auftreten, und so häufiger eine Quellereinigung vorgenommen werden muß, haben wir die Elektronenstoßionisierung vorgezogen, statt auf die Benutzung von Acetatderivaten überzugehen.

Aufgrund dieser Entscheidung und der Überlegung in 4.4.4, daß SIM für die Isotopenverhältnismessungen erwünscht ist, wurden die folgenden Ionenmassen für SIM gewählt: Für Chenodesoxycholsäure die Massen 370 und 371 (für die ^{12}C und ^{13}C -Isotopen) und für die Cholsäure die Massen 458 und 459.

4.4.6. Empfindlichkeitsbestimmende Faktoren

Die am schwierigsten durchzuführenden Messungen sind diejenigen im Nüchternserum von Normalpersonen. Die in unserem Labor mit Gaschromatographie hierfür ermittelten Werte lagen für Cholsäure bei $0,87 \pm 0,81 \mu\text{mol/l}$ (niedrigster Wert $0,08 \mu\text{mol/l}$) und für Chenodesoxycholsäure bei $1,59 \pm 1,13 \mu\text{mol/l}$ (niedrigster Wert $0,35 \mu\text{mol/l}$). Ausgehend von 2ml Serum, einer Analyse an 4% der Gesamtmenge (2 μl aus 50 μl Endlösung) und einer Wiederfindungsrate von 80% sind die auf die Gaschromatographiesäule injizierten Mengen bei den niedrigsten Konzentrationen 5pmol für Cholsäure und 22pmol für Chenodesoxycholsäure. Da es notwendig ist, auch im niedrigsten Konzentrationsbereich eine ausreichende Empfindlichkeit zu gewährleisten, sollen die empfindlichkeitsbestimmenden Faktoren kurz betrachtet werden:

- a) Die Probenvorbereitung besteht aus mehreren Vorgängen, die alle zu Verlusten führen können, wobei die zwei notwendigen Extraktionen die wichtigsten Verlustfaktoren darstellen. Ein 10%iger Verlust in beiden Schritten verringert die Wiederfindung schon auf 81%.

- b) Die Instabilität der Derivate spielt bei den verwendeten Methyl-TMS-Derivaten eine wichtige Rolle. Deshalb sollte die Bestimmung sofort nach der Silylierungsreaktion durchgeführt werden.
- c) Die Gaschromatographiesäule muß so gewählt werden, daß neben einer guten Trennung auch kurze Retentionszeiten gewährleistet werden, die intensive schmale Peaks ergeben. Kapillargaschromatographie ist deshalb empfehlenswert.
- d) Die Injektionstechnik soll der Flüchtigkeit der Substanzen und der auf die Säule zu bringenden Menge angepaßt werden. Für die Gallensäurederivate kommt bei niedrigen Serumkonzentrationen im Falle der Kapillargaschromatographie nur ein Solidinjektor oder ein On-column Injektor in Frage.
- e) Das Fragmentierungsmuster spielt hauptsächlich für Cholsäure eine wichtige Rolle. Dies dürfte aus einem Vergleich mit Chenodesoxycholsäure klar werden. Unter der Annahme, daß die erste Ionisierungsreaktion für die Methyl-TMS-Derivate der beiden Gallensäuren gleich effektiv verläuft, darf man die beiden Fragmentierungsmuster vergleichen. Das Molekularion der Chenodesoxycholsäure wird hauptsächlich in ein Fragment gespalten (m/z 370). Das Molekularion der Cholsäure dagegen wird in drei Fragmentionen mit unterschiedlichen Intensitäten gespalten. Vergleichend läßt sich vorhersagen, daß die Intensität des Fragmentions mit m/z 458 nur 20% der Intensität des m/z 370 Fragment der Chenodesoxycholsäure beträgt. Diese Tatsache und die niedrigere Konzentration der Cholsäure im Serum sind der Hauptgrund dafür, daß die Isotopenverhältnismessung für Cholsäure prinzipiell schwieriger ist als diejenige für Chenodesoxycholsäure. Eine Beeinflussung des Fragmentationsmusters ist nur in geringem Ausmaß möglich. Leichte Verschiebungen des intensivsten Ions in den höheren Massenbereich können durch Verringerung der Quellentemperatur und der Elektronenenergie erreicht werden. Da aber die letzte Möglichkeit einen allgemeinen Intensitätsverlust zur Folge hat, wird der erwünschte Effekt nur teilweise oder gar nicht erreicht.

- f) Als Tuning des Massenspektrometers bezeichnet man das Einstellen des Linsensystems zur Optimierung des Durchgangs der Ionen von der Ionenquelle in den Analysatorteil, wobei eine falsche Einstellung Empfindlichkeitsverluste mit sich bringt.
- g) Die Stabilität der Massenspektrometerelektronik ist gerade für die Isotopenverhältnismessungen ein wichtiger Faktor. Schnelle Schwankungen der Masseneinstellung verursachen nicht reproduzierbare Messungen, während langsames "Drifting" die Empfindlichkeit beeinflusst, da die Intensitäten nicht mehr im Massenzentrum gemessen werden.
- h) Auch der Zustand der Ionenquelle, des Massenfilters und der Elektronenmultiplier beeinflusst die Empfindlichkeit der Messung stark. Eine Verschmutzung der Quelle und des Massenfilters durch häufige Analysen von verunreinigten Proben führt zu einer Beeinträchtigung von Energieübertragung und Ionentransport. Dies wiederum vermindert die Empfindlichkeit. Elektronenmultiplier haben eine beschränkte Lebensdauer, und ihr Verstärkungsvermögen nimmt mit der Zeit ab.
- i) Von ebenso großer Wichtigkeit ist die Erstellung des SIM-Programms. Das übliche Massenspektrum wird über einen Rechner als ein Strichmuster dargestellt und ist nur eine vereinfachte Darstellung. In Wirklichkeit stellt jeder Strich eine Gauß'sche Verteilung dar mit einer Basisbreite von einer Masseneinheit. Im Computerbild fällt der Strich mit dem eigentlichen Massenzentrum zusammen. Bei der Erstellung des SIM-Programms muß jeweils ein zu detektierender Massenbereich und eine Verweildauer zur Detektion dieses Massenbereiches eingegeben werden. Das Massenzentrum muß richtig eingestellt und der Massenbereich muß richtig gewählt werden. Dieser Massenbereich wird dabei symmetrisch um das Massenzentrum gelegt, wobei als Grenze die maximale Breite einer Masseneinheit gilt. Auf diese Weise können kleine Massenbereiche mit höherer Empfindlichkeit gemessen werden. Eine längere Verweildauer führt automatisch zu einer höheren Empfindlichkeit. Wie bereits erwähnt, ist die Scanzeit und damit auch die SIM-Verweildauer durch die Breite des chromatographischen Peaks begrenzt. Wie in 4.4.4 aufgeführt wurde, sollen minimal 20 Scans pro Peak gewährleistet sein.

5. BERECHNUNG DER POOLGRÖSSE UND DER SYNTHESERATE

5.1. Atom percent excess, Poolgröße und Syntheserate

Zunächst wird das natürliche Isotopenverhältnis (natural abundance, R_0) der Gallensäuren in einer Serumprobe vor Applikation einer Markierung bestimmt. Nach Verabreichung der ^{13}C -markierten Gallensäure, oral oder i.v., ändert sich dieses Verhältnis (R). Der sich daraus ergebende Überschuß an markierter Substanz, i.e. Atom percent excess (20), wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Atom percent excess} = \frac{R'}{1 + R'} \times 100\%, \text{ wobei } R' = R - R_0.$$

Der Atom percent excess-Wert nimmt nach Verabreichung der markierten Substanz exponentiell entsprechend einer Kinetik der 1. Ordnung ab. Bei semilogarithmischer Darstellung ergibt dies einen linearen Abfall (Abb.11). Dabei ist die Steilheit dieses Abfalls in der graphischen Darstellung ein direktes Maß für die fraktionelle Umsatzrate der endogenen Substanz. Aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der

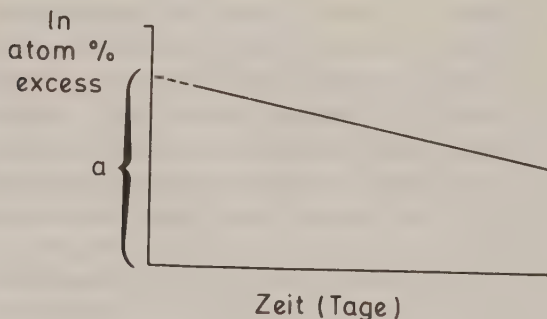


Abb. 11. Zeitabhängigkeit des Atom percent excess-Wertes nach Verabreichung stabil markierter Gallensäuren.

Y-Axis (a), der Dosis der markierten Substanz (D) und deren Markierungsgrad (g) kann die Größe berechnet werden:

$$\text{Poolgröße} = \frac{100 \times D \times g}{e^a} - D$$

Die Syntheserate der Gallensäure errechnet sich dann als Produkt von Poolgröße und fraktioneller Umsatzrate.

5.2. Genauigkeitsbedingungen für die Isotopenverhältnismessungen

Wie schon in 3.2.1 erwähnt, wird die Dosierung von ^{13}C -markierten Gallensäuren nach oben durch die Poolgröße limitiert, da eine Beeinflussung der Biosynthese vermieden werden soll. Eine mehr als 10%ige Vergrößerung des Pools soll deshalb nicht überschritten werden. Ausgehend von einem normalen Cholsäure-Pool von 1g und einer Dosierung von ^{13}C -markierter Cholsäure von 50mg kann man einen Atom percent excess-Wert zur Zeit der Dosierung von ungefähr 5% erwarten. Dieser Wert fällt im Laufe der folgenden 4 Tage auf 1 - 2% ab. Diese geringen Unterschiede erfordern eine hohe Reproduzierbarkeit der Isotopenverhältnismessungen und wohl einen Variationskoeffizienten kleiner als 1%.

6. EXPERIMENTELLER TEIL

6.1. Protokoll

Um Poolgröße und Syntheserate für Chenodesoxycholsäure und Cholsäure gleichzeitig zu bestimmen, wurden abends um 20.00 Uhr 50mg $24\text{-}^{13}\text{C}$ -Cholsäure und 50mg $24\text{-}^{13}\text{C}$ -Chenodesoxycholsäure oral in 200ml 0,25%iger Natriumbikarbonatlösung verabreicht. Während der nächsten 4 Tage wurden dem Probanden morgens und abends jeweils 10ml venöses Blut abgenommen. Um den Einfluß der postprandialen Blutabnahme zu bestimmen, wurde in einigen Fällen sowohl nüchtern als auch postprandial Blut gesammelt. Zur Bestimmung des natürlichen Isotopenverhältnisses der Gallensäuren wurden vor der Applikation der markierten Substanz 10ml Blut entnommen. Während der Versuche wurden zu den gleichen Zeitpunkten über eine Duodenalsonde 2 - 3ml Galle gewonnen, wobei die Gallenblase mit 1 Ivy dog Einheit pro kg/Körpergewicht Cholecystokinin stimuliert wurde. Das abzentrifugierte Serum und die Galle wurden bei -20°C eingefroren und gelagert.

6.2. Probenvorbereitung

Zur Extraktion wurden die Serumproben zuerst mit 0,1N NaOH verdünnt (1:4v/v) und die Lösungen zur Spaltung der Albuminbindung der Gallensäuren auf 64°C erwärmt. Mittels einer Vac-Elut Vorrichtung wurde jede Probe dann durch eine 1ml Bond Elut Kartusche gesaugt (1 - 2ml/min). Nach Waschen der Kartuschen mit 0,1N NaOH und Wasser wurden die Gallensäuren mit 6ml 75%igem Methanol eluiert. Die Benutzung dieser Vorrichtung erlaubt die Extraktion der Gallensäuren aus 10 Serumproben innerhalb von 30 Minuten. Eine weitere Reinigung der Proben wurde durch eine n-Hexan-Extraktion des Eluats nach Ansäuern auf pH 3 - 4 erreicht. Nach Eindampfen des Eluats wurden die Gallensäurensulphate mit einem angesäuerten Gemisch (pH 1)

von Methanol und Aceton (1:9, v/v) für 3 Stunden bei 37°C solvolysiert. Anschließend wurden die Proben neutralisiert und eingedampft. Zur Abspaltung der Glyzin- und Tauringruppen wurde die enzymatische Methode gewählt. Hierzu wurden 100 Einheiten der hochgereinigten Cholylglycinhydrolase mit 0,2M EDTA- und 0,2M Merkaptoethanol-Lösung zugegeben. Die Reaktion lief in einem Natriumacetatpuffer (pH 5,6) bei 37°C ab. Für die wichtigsten Gallensäuren Cholsäure, Chenodesoxycholsäure und Desoxycholsäure genügt eine Reaktionsdauer von 2 Stunden. Die so entstandenen freien Gallensäuren wurden mit Lipidex 1000 extrahiert. Dazu wurde die wässrige Lösung auf pH 3 - 4 eingestellt und mit Hilfe der Vac-Elut Vorrichtung durch die 4 x 0,8cm Lipidex 1000 Säulen gesaugt. Nach Waschen der Säulen mit Wasser wurden die Gallensäuren mit 75%igem Methanol eluiert. Dieses Eluat wurde dann eingedampft. Die Methylierung der Karboxylgruppen wurde in 2ml einer angesäuerten (pH 1) Mischung von Methanol und 2,2 Dimethoxypropan (1:1, v/v) über 30 Minuten bei Zimmertemperatur durchgeführt. Die Trimethylsilylierung der Hydroxylgruppen erfolgt mit Hilfe von 400 μ l einer Mischung von Hexamethyldisilan und Trimethylchlor-silan in Pyridin (2:1:3, v/v) über 15 Minuten bei 60°C unter Stickstoff. Detailliertere Angaben über die Probenvorbereitung können dem Arbeitsprotokoll in Appendix 1 entnommen werden. Nach Eindampfen der Silylierungslösung wurde die Probe in Isooktan gelöst (25-50 μ l).

6.3. Gaschromatograph-Massenspektrometer

Ein Carlo Erba Gaschromatograph, Modell Fractovap 4160 wurde mittels eines heizbaren Kapillarinterface nach Blum (16) mit der Ionenquelle einer Finnigan 4021 Quadrupolmassenspektrometer - Datensystem - Kombination verbunden.

6.3.1. Gaschromatographische Bedingungen

Zur Trennung der Methyl-TMS-Derivate der Gallensäuren wurde ursprünglich eine Glaskapillarsäule (20m x 0.30mm), belegt mit Carbo-

wax 20M auf Bariumkarbonatkristallen (Jaeggi, Trogen, Schweiz) benutzt, die über eine Glaskapillare mit der Ionenquelle verbunden war. Da die Carbowax 20M-Säule eine relativ kurze Lebensdauer hat, wurde diese Säule durch eine fused silica Säule mit chemisch gebundenen OV-1701 (25m x 0,32mm) ersetzt. Die Vorteile dieser Säule liegen in einer höheren Thermostabilität, einer größeren Flexibilität und der Möglichkeit der Wiederverwendung nach Reinigung. Darüberhinaus kann diese Säule (CP Sil 19 CB, Chrompack, Middelburg, Niederlande) ohne Interface direkt mit der Ionenquelle verbunden werden. Die Trennung der wichtigsten Gallensäuren ist auf dieser Säule sehr gut (Abb.12). Zusätzlich bietet die OV-1701 Säule Vorteile hinsichtlich des Nachweises und der Quantifizierung nicht nur normaler, sondern auch atypischer Gallensäuren, was die allgemeine Verwendbarkeit dieser Säule erhöht.

Bei beiden Säulen wurde mit Hilfe eines On-column Injektors bei einer niedrigen Temperatur injiziert. Die optimale Temperatur liegt möglichst nahe beim Siedepunkt des benutzten Lösungsmittels. Bei Verwendung von n-Hexan als Lösungsmittel wurde bei 100°C injiziert, bei Verwendung von Isooktan bei 140°C unter zusätzlicher Kühlung des Injektors. Bei Benutzung der Carbowax 20M-Säule wurde die Temperatur des Ofens manuell auf 200°C geschaltet und anschließend ein Temperaturprogramm, beginnend mit 200°C bis 240°C mit 4°/min angewandt. Der Heliumdruck betrug 1,9kg/cm². Die OV-1701 Säule wurde bei niedrigerem Druck (0,8kg/cm²) und bei höherer Temperatur betrieben. Dabei wurde die Temperatur von 140°C um 10°/min auf 270°C erhöht und über 8min auf diesem Wert gehalten. Anschließend wurde ein zweites Programm von 270°C bis 300°C, 10°/min angewandt, um mögliche spät eluierende Substanzen auszuheizen. Bei beiden Säulen wurde die Interface-Temperatur auf 230°C eingestellt.

6.3.2. Massenspektrometrische Bedingungen

Das Hochvakuum in der Ionenquelle bewegte sich unter Durchfluß von Helium zwischen etwa $1,3 \times 10^{-6}$ Torr bei einer Ofentemperatur von 100°C und 8×10^{-7} Torr bei 270°C. Die Temperatur der Ionenquelle wurde auf:

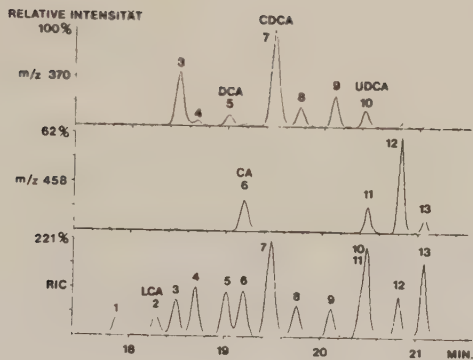


Abb. 12. Kapillargaschromatographische Trennung der Methylester-TMS-derivate verschiedener Gallensäuren. RIC = Reconstructed Ion Chromatogram

1. Isolithocholsäure
2. Lithocholsäure (LCA)
3. Isochenodesoxycholsäure
4. Isodesoxycholsäure
5. Desoxycholsäure (DCA)
6. Cholsäure (CA)
7. Chenodesoxycholsäure (CDCA)
8. 3 β -5-Cholensäure
9. Hyodesoxycholsäure
10. Ursodesoxycholsäure (UDCA)
11. Ursocholsäure
12. Hyocholsäure
13. β -Muricholsäure

180°C gehalten, um die Fragmentierung einzuschränken. Die Elektronenstoßionisation fand bei 70 eV und 0,3 mA Elektronenenergie statt. Die Linseneinstellung wurde vor jeder Probenreihe mit Hilfe des Kalibriergases FC43 neu kontrolliert. Die Elektronenmultiplierspannung betrug 1700 - 1800 V.

Nach Einstellung der elektronischen Linsen wurde unter Scanbedingungen von einer Standardmischung aus Gallensäurederivaten eine Messung gemacht, um die exakte Masse jeder Fragmentation zu bestimmen. Diese sich daraus ergebenden exakten Massen wurden als Massenzentren für das SIM-Programm gewählt. Der Massenbereich wurde ursprünglich auf 0,5 Masseneinheiten festgelegt, aber später zur Erhöhung der Empfindlichkeit auf 0,125 Masseneinheiten eingeengt. Die Verweildauer für jeden Massenbereich betrug für die Carbowax 20M-Säule 100msec, für die OV-1701 Säule 50msec. Nach Detektion der ausgewählten Ionen wurde das Totalionenstromchromatogramm aufgezeichnet und die Massenchromatogramme ermittelt. Für jede Substanz wurden etwa 20 Meßpunkte erzielt. Die Scanintensitäten wurden summiert und für das Untergrundsignal korrigiert. Anschließend wurde das Verhältnis der Isotopintensitäten berechnet.

Jede Bestimmung wurde zweifach durchgeführt. Bestand ein Unterschied von mehr als 0,005 zwischen dem im ersten und im zweiten Lauf gemessenen Isotopenverhältnis, so wurde eine dritte Messung vorgenommen.

6.3.3. Mathematische Beschreibung der Abnahme des Atom percent excess-Wertes

Die Abnahme des Atom percent excess-Wertes wurde mit Hilfe linearer Regression berechnet. Es wurden nur Kurven mit Korrelationskoeffizienten über 0,9 akzeptiert. Bei Nichterfüllung dieses Kriteriums erfolgte eine Wiederholungsmessung der ganzen Meßreihe.

7. ERGEBNISSE

7.1. Isotopentrennung

Die Abbildung 13 zeigt die Anwendung der o.a. Methode bei einem gesunden Probanden. Es sind jeweils die ^{12}C - und ^{13}C -Anteile der Cholsäure- und Chenodesoxycholsäurepeaks aufgezeichnet, die mit Hilfe der charakteristischen Massen 370 und 371 für Chenodesoxycholsäure und 458 und 459 für Cholsäure ermittelt wurden. Die für diesen Probanden gefundene Abfallkurve der Atom percent excess-Werte im Serum ist in Abb.14 dargestellt.

7.2. Reproduzierbarkeit der Isotopenverhältnismessungen

Wie aus Tabelle II hervorgeht, wurden im Serum und in der Galle

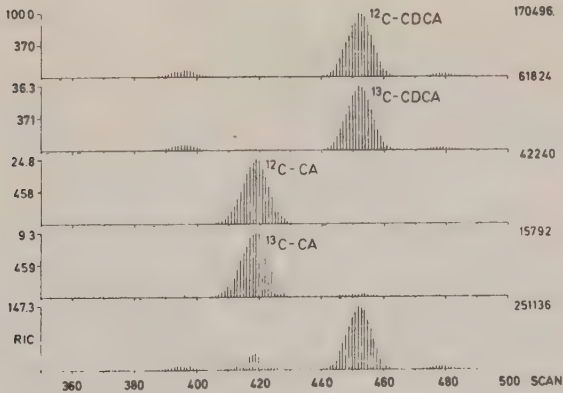


Abb.13. Isotopentrennung mittels Selected Ion Monitoring für Cholsäure (CA) und Chenodesoxycholsäure (CDCA) aus dem Serum eines gesunden Probanden.
RIC = Reconstructed Ion Chromatogram.

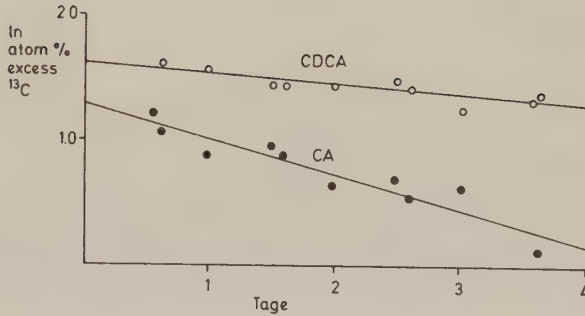


Abb. 14. Abfallkurve für die Atom percent excess- Werte von Cholsäure (CA) und Chenodesoxycholsäure (CDCA), gemessen im Serum eines gesunden Probanden.

Proband	Cholsäure		Chenodesoxycholsäure	
	Galle	Serum	Galle	Serum
Intraindividuelle Variationen*				
1	0,3643 ± 0,0010 VK 0,3%	0,3604 ± 0,0008 VK 0,2%	0,3204 ± 0,0004 VK 0,1%	0,3177 ± 0,0006 VK 0,2%
2	0,3633 ± 0,0009 VK 0,3%	0,3674 ± 0,0010 VK 0,3%	0,3167 ± 0,0007 VK 0,2%	0,3212 ± 0,0012 VK 0,4%
Interindividuelle Variationen*				
1	0,3643	0,3604	0,3204	0,3177
2	0,3633	0,3674	0,3167	0,3212
3	0,3649	0,3640	0,3200	0,3290
4	0,3678	0,3745	0,3269	0,3290
5	0,3643	0,3616	0,3129	0,3172
6	0,3678	0,3659	0,3212	0,3166
7	0,3617	0,3609	0,3175	0,3167
8	0,3570	0,3612	0,3232	0,3233
Σ	0,3639 ± 0,0035 VK 1,0%	0,3645 ± 0,0048 VK 1,3%	0,3199 ± 0,0043 VK 1,3%	0,3208 ± 0,0046 VK 1,4%

Tab. II. Intraindividuelle und interindividuelle Variationen bei der Bestimmung der natürlichen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ - Isotopenverhältnisse von Cholsäure und Chenodesoxycholsäure im Serum verschiedener Probanden.

* Mittelwert aus 3 Bestimmungen ; VK = Variationskoeffizient

ähnliche natürliche Isotopenverhältnisse gemessen. Auch bei verschiedenen Probanden konnten in dieser Hinsicht keine Unterschiede gefunden werden. Dies bestätigt die Reinheit der Serumextrakte und die ausreichende Trennkapazität der Kapillargaschromatographie sowie die Stabilität und die Empfindlichkeit des Meßsystems.

7.3. Genauigkeit der Atom percent excess-Bestimmungen

Diese wurde mit Hilfe von Standardmischungen von $24\text{-}^{13}\text{C}$ -Gallensäuren und ihren natürlichen Homologen in verschiedenen Verhältnissen geprüft. Ebenso wurde geprüft, ob die Genauigkeit sich mit dem Volumen der injizierten Menge ändert. Vergleiche zwischen den gemessenen Werten und den aus den Mischungsverhältnissen berechneten Werten zeigten Korrelationen, wie sie in Abbildung 15 angegeben sind. Die berechneten Werte in Abbildung 15 sind nicht für den Markierungsgrad der ^{13}C -markierten Substanz korrigiert. Der Markierungsgrad

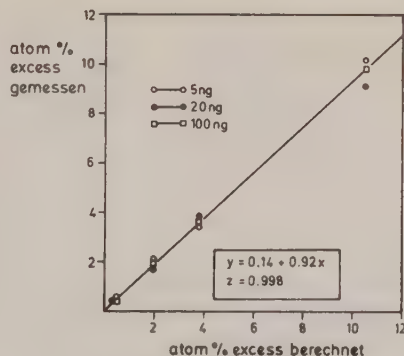
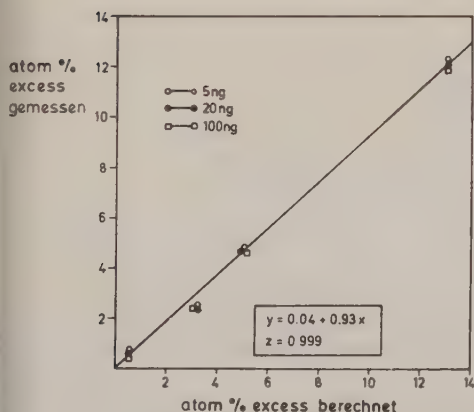


Abb. 15. Genauigkeit der Bestimmung des Atom percent excess- Wertes bei verschiedenen Injektionsmengen. A. Cholsäure B. Chenodesoxycholsäure

von 90% erklärt die Diskrepanz zwischen den gefundenen Steigungen der Kurven (0,93 für Cholsäure und 0,92 für Chenodesoxycholsäure) und der idealen Steigung von 1,00. Es wurden keine wesentlichen Unterschiede gefunden, wenn die auf die Gaschromatographiesäule injizierte Menge von 100ng auf 5ng verringert wurde.

7.4. Biologische und meßtechnische Streuung der gemessenen Poolgrößen, fraktionellen Umsatzraten und Syntheseraten

Da die Bestimmung der Poolgrößen und Syntheseraten der primären Gallensäuren nur sinnvoll ist, wenn diese reproduzierbar gemessen werden können, wurden bei einem freiwilligen gesunden Probanden die genannten Parameter für Chenodesoxycholsäure innerhalb von 6 Monaten 3 mal bestimmt. Die drei Werte zeigten Variationskoeffizienten unter 20% für die Poolgröße, die fraktionelle Umsatzrate und die Syntheserate (Tab.III).

	Nov.	Jan.	März	$\bar{x} \pm SD$	VK
Pool ($\mu\text{mol kg}^{-1}$)	17,4	23,1	26,6	$22,4 \pm 4,6$	20%
Fraktionelle Umsatzrate (d^{-1})	0,36	0,35	0,28	$0,33 \pm 0,04$	13%
Syntheserate, ($\mu\text{mol kg}^{-1} \text{d}^{-1}$)	6,2	8,1	7,5	$7,3 \pm 1,0$	13%

Tab. III. Biologische und meßtechnische Streuung der Poolgröße, der fraktionellen Umsatzrate und Syntheserate von Chenodesoxycholsäure, gemessen im Serum eines gesunden Probanden.

7.5. Vergleiche der im Serum und in der Galle gemessenen kinetischen Parameter

Bei 3 gesunden Probanden wurden die Poolgrößen, die fraktionellen Umsatzraten und die Syntheseraten sowohl im Serum als auch in der Galle gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV dargestellt. Die im Serum gemessenen Poolgrößen für Cholsäure und Chenodesoxycholsäure stimmten sehr gut mit den in der Galle gemessenen Werten überein. Die maximale Abweichung betrug für Cholsäure 11,4% und für Chenodesoxycholsäure 17,2%. Die im Serum gemessenen fraktionellen Umsatzraten für Chenodesoxycholsäure waren den in der Galle gemessenen Werten sehr ähnlich (maximale Abweichung 19,1%). Bei 2 von 3 Probanden stimmten die fraktionellen Umsatzraten für Cholsäure gut überein (Abweichungen 0% und 1,2%). Im Falle von Proband EG aber wurde ein großer Unterschied gefunden: $0,10d^{-1}$ in der Galle vs $0,28d^{-1}$ im Serum). Da die Syntheserate aus dem Poolwert und dem Wert der fraktionellen Umsatzrate berechnet wird, fand sich auch hier eine gute Übereinstimmung außer für Cholsäure beim Probanden EG.

Proband		Cholsäure		Chenodesoxycholsäure	
		Serum	Galle	Serum	Galle
RE	Pool ($\mu\text{mol kg}^{-1}$)	13,3	13,2	15,6	15,8
	Frakt.Ums.Rate (d^{-1})	0,85	0,84	0,35	0,38
	Synth.Rate ($\mu\text{mol kg}^{-1}d^{-1}$)	11,3	11,1	5,5	6,0
KK	Pool ($\mu\text{mol kg}^{-1}$)	26,5	29,9	35,7	34,2
	Frakt.Ums.Rate (d^{-1})	0,38	0,38	0,17	0,21
	Synth.Rate ($\mu\text{mol kg}^{-1}d^{-1}$)	10,0	11,4	6,1	7,2
EG	Pool ($\mu\text{mol kg}^{-1}$)	52,9	51,3	38,9	33,2
	Frakt.Ums.Rate (d^{-1})	0,28	0,10	0,08	0,08
	Synth.Rate ($\mu\text{mol kg}^{-1}d^{-1}$)	14,8	5,1	3,1	2,6

Tab. IV. Vergleich von Poolgrößen, fraktionellen Umsatzraten und Syntheseraten der Cholsäure und Chenodesoxycholsäure, die gleichzeitig im Serum und in der Galle gemessen wurden.

7.6. Ergebnisse bei gesunden Probanden

Zusätzlich zu den drei in 7.5 erwähnten gesunden Probanden wurde bei zwei weiteren Normalpersonen die Gallensäurenkinetik im Serum gemessen. Mit Hilfe der insgesamt bei 5 Personen aus Serumproben ermittelten Werte für Poolgröße, fraktionelle Umsatzrate und Syntheserate wurde ein Normalkollektiv beschrieben (Abb.16). Die Pools von Cholsäure ($31,8 \pm 16,0 \mu\text{mol/kg}^{-1}$) und Chenodesoxycholsäure ($32,6 \pm 9,9 \mu\text{mol kg}^{-1}$) waren im Mittel ungefähr gleich groß, während die fraktionellen Umsatzraten und Syntheseraten für Cholsäure ($0,48 \pm 0,22 \text{d}^{-1}$ und $13,3 \pm 4,9 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{d}^{-1}$) deutlich höher waren als für Chenodesoxycholsäure ($0,24 \pm 0,13 \text{d}^{-1}$ und $7,0 \pm 3,6 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{d}^{-1}$).

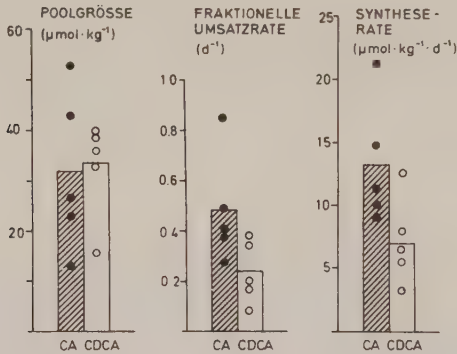


Abb.16. Werte für die Poolgrößen, fraktionelle Umsatzraten und Syntheseraten der Cholsäure (CA) und Chenodesoxycholsäure (CDCA), gemessen im Serum von 5 gesunden Probanden nach Verabreichung von $24\text{-}^{13}\text{C-CA}$ und $24\text{-}^{13}\text{C-CDCA}$.

8. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode beschrieben, die es erstmals gestattet, die Poolgrößen und fraktionellen Umsatzraten der primären Gallensäuren Cholsäure und Chenodesoxycholsäure gleichzeitig mit Hilfe von stabil markierten Gallensäuren und Serumproben zu bestimmen. Die dazu notwendigen Isotopenverhältnismessungen mittels kombinierter Gaschromatographie/Massenspektrometrie zeigten sich hinsichtlich Genauigkeit und Reproduzierbarkeit zuverlässig. Auch ließen sich der Abfall der Atom-percent-excess-Werte über die Zeit gut durch eine Funktion 1. Ordnung beschreiben, was die Annahme eines Einkompartiment-Systems bestätigt. Die Beobachtung, daß sich die Poolgröße und die Umsatzrate von Chenodesoxycholsäure über einen Zeitraum von sechs Monaten nur wenig ändern, zeigt, daß die gemessenen Parameter sinnvolle, reproduzierbar meßbare Größen darstellen.

Die gute Übereinstimmung zwischen den im Serum und in der Galle gemessenen Werten bestätigte die Annahme, daß sich bei gesunden Probanden genügend rasch ein Gleichgewicht zwischen den im systemischen und enterohepatischen Kreislauf befindlichen Anteilen des Gallensäurenpools einstellt. So konnte eine Abnahme des Isotopenverhältnisses im enterohepatischen Kreislauf durch die Bestimmung dieses Verhältnisses im Serum erfaßt werden, obwohl nur weniger als 1% des Gallensäurenpools im systemischen Kreislauf zirkulieren. Nur bei Probanden, bei denen der systemische Anteil des Gallensäurenpools und somit auch die Gallensäurenkonzentrationen im Serum extrem klein sind, ist mit Schwierigkeiten und Störfaktoren bei den Bestimmungen im Serum zu rechnen. Dies dürfte bei dem gesunden Probanden EG der Fall gewesen sein, bei dem für Cholsäure im Serum eine höhere Umsatzrate ($0,28d^{-1}$) als in der Galle ($0,10d^{-1}$) gefunden wurde. Die mit Hilfe der Serumbestimmungen ermittelte Größe des Cholsäurepools ($52,9\mu\text{mol kg}^{-1}$) war identisch mit der über die Galle errechneten ($51,3\mu\text{mol kg}^{-1}$). Bei diesem Probanden (EG) wurden sehr niedrige Serumspiegel von Cholsäure gefunden (Nüchterncholsäurespiegel von $0,12\mu\text{mol l}^{-1}$ und postprandiale Spie-

gel von $0,47\mu\text{mol l}^{-1}$). Ausgehend von 3 Litern Serum kann daraus ein "systemischer Cholsäurepool" im Nüchternzustand von $0,36\mu\text{mol}$ berechnet werden, welcher nur 0,01% des enterohepatischen Pools ausmacht. Bei den anderen Normalpersonen betrug der systemische Cholsäurepool im Nüchternzustand annähernd 0,1% des enterohepatischen Pools. Für Chenodesoxycholsäure wurde bei dem gleichen Probanden über Serum und Galle vergleichbare Poolgrößen (38,9 und $33,2\mu\text{mol kg}^{-1}$) und fraktionelle Umsatzraten ($0,08$ und $0,08\text{d}^{-1}$) gefunden. Der Nüchternserumspiegel für Chenodesoxycholsäure betrug $0,54\mu\text{mol l}^{-1}$, was auf einen nüchtern systemischen Chenodesoxycholsäurepool von $1,62\mu\text{mol}$ oder 0.1% des enterohepatischen Pools schließen läßt. Dies könnte erklären, warum die Unterschiede zwischen den im Serum und in der Galle gefundenen fraktionellen Umsatzraten sich bei diesem Probanden nur auf Cholsäure beschränken.

Das Kollektiv gesunder Probanden ist zu klein, um verlässliche Referenzwerte daraus abzuleiten. Es gestattet aber einen Vergleich der mit der beschriebenen Methode gefundenen Werte mit jenen der Literatur. Unsere Daten bestätigen die allgemein akzeptierte Auffassung, daß die Poolgrößen der Cholsäure und der Chenodesoxycholsäure bei gesunden Probanden im Mittelwert annähernd gleich sind. Auch unterstützen sie die Ergebnisse anderer Autoren, wonach die fraktionelle Umsatzrate der Chenodesoxycholsäure im Durchschnitt kleiner als jene der Cholsäure ist. Dies dürfte durch die bessere Resorption von Chenodesoxycholsäure in höheren Dünndarmabschnitten und damit bessere Konservierung bedingt sein. Aus diesem Grunde kann auch die Syntheserate geringer sein. Was die absoluten Werte für die Poolgrößen, fraktionellen Umsatzraten und Syntheseraten betrifft, stimmen unsere Daten gut mit den in der Literatur veröffentlichten Daten überein, obwohl sehr unterschiedliche Normalwerte genannt werden. Am besten lassen sich unsere Werte mit Publikationen von van der Werf (142), Huybregts (61), Rutgeerts (108) und Hepner (54) vergleichen (Tabelle V). Diese Werte wurden mit Hilfe von ^{14}C -Messungen in der Duodenalgalle bestimmt. Darüberhinaus ist es von besonderem Interesse, unsere Daten mit denen von Everson et al (38,39) zu vergleichen (Tabelle VI), da diese mit ^{13}C -markierten Gallensäuren im Serum bestimmt wurden. Für Chol-

Cholsäure

	Van der Werf (142)	Lindstedt (75)	Hepner (53)	Huybrechts (61)	Rutgeerts (108)	Eigener Befund
Pool ($\mu\text{mol kg}^{-1}$)	19,6 - 91,7	50*	30*	50*	40*	$31,8 \pm 16,0$
Prakt. Ums. Rate (d^{-1})	0,09 - 0,43		0,36*	0,18-0,37	0,12-0,63	$0,48 \pm 0,22$
Syntheserate, ($\mu\text{mol kg}^{-1} \text{d}^{-1}$)	6 - 18	13*	9,5*	8 - 20	14*	$13,3 \pm 4,9$

Chenodesoxycholsäure

Pool ($\mu\text{mol kg}^{-1}$)		20*	35*	40*		$32,6 \pm 9,9$
Prakt. Ums. Rate (d^{-1})		0,15-0,43		0,10-0,33		$0,24 \pm 0,13$
Syntheserate, ($\mu\text{mol kg}^{-1} \text{d}^{-1}$)		5,3*		11*		$7,0 \pm 3,6$

Tab. V. Vergleich von den gefundenen Poolgrößen, fraktionellen Umsatzraten und Syntheseraten der primären Gallensäuren bei gesunden Probanden mit den in der Literatur beschriebenen Werte, welche mit Hilfe radioaktiver Gallensäuren und Galleabnahmen bestimmt wurden.

* Werte als mg oder mmol angegeben; Mittelwert wurde auf 70 kg Körpergewicht umgerechnet. + Median

	Cholsäure	Chenodesoxycholsäure
Pool ($\mu\text{mol kg}^{-1}$)	12,5 - 40	9,2 - 16,0
Frakt. Ums. Rate (d^{-1})	0,19 - 0,80	0,19 - 0,29
Syntheserate, ($\mu\text{mol kg}^{-1} \text{d}^{-1}$)	7,8 - 10,9	2,6 - 3,9

Tab. VI. Literaturwerte (Everson 38,39) für Poolgrößen, fraktionelle Umsatzraten und Syntheseraten von Cholsäure und Chenodesoxycholsäure, gemessen im Serum gesunder Probanden nach Verabreichung $24\text{-}^{13}\text{C}$ -Gallensäuren.

säure besteht eine gute Übereinstimmung aller drei Parameter, für Chenodesoxycholsäure findet Everson et al (38,39) aber Werte, die für die Poolgröße und Syntheserate kleiner sind als unsere und andere in der Literatur beschriebene Werte.

Innerhalb des auf den Serumbestimmungen beruhenden Normalkollektivs fallen einige Personen auf. Für RE wurde eine sehr kleine Poolgröße für Cholsäure mit einer hohen fraktionellen Umsatzrate gefunden ($13,3 \mu\text{mol kg}^{-1}$, $0,85 \text{d}^{-1}$). Die berechnete Syntheserate liegt mit $11,3 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ im Bereich der anderen Normalpersonen. Sein Chenodesoxycholsäurepool ($15,6 \mu\text{mol kg}^{-1}$) ist auch relativ klein und die Umsatzrate hoch ($0,35 \text{d}^{-1}$). Die Syntheserate ($5,5 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{d}^{-1}$) ist aber wieder normal. SF fällt wegen den, bei durchschnittlichen Poolgrößen ($43,2 \mu\text{mol kg}^{-1}$ für Cholsäure und $33,1 \mu\text{mol kg}^{-1}$ für Chenodesoxycholsäure) hohen Umsatzraten ($0,49$ für Cholsäure und $0,38 \text{d}^{-1}$ für Chenodesoxycholsäure) auf. Deshalb sind die berechneten Syntheseraten die höchsten des ganzen Kollektivs ($21,2 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ für Cholsäure und $12,6 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ für Chenodesoxycholsäure). Bei dieser Person wurde auch die 24 Stunden Stuhlausscheidung von Gallensäuren bestimmt (64). Diese betrug $35,2 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ und stimmte somit gut mit der Gesamtsynthese ($33,3 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{d}^{-1}$) überein. Dies zeigt, daß die hohen Syntheseraten von SF mit einer relativ hohen Stuhlausscheidung zu vereinbaren sind.

Die hier erzielten Ergebnisse zeigen die Möglichkeit, bei Normalpersonen die Poolgröße und die fraktionellen Umsatzraten für Cholsäure und Chenodesoxycholsäure gleichzeitig im Serum zu messen. Die hier zugrunde liegende Voraussetzung des isotopischen Gleichgewichtes zwischen Serum und Galle ist aber möglicherweise bei Patienten mit bestimmten hepatobiliären Störungen nicht vorhanden. Deshalb ist eine weitere Validierung dieses Gleichgewichtes bei solchen Patienten notwendig. In erster Instanz kommen dafür Patienten mit cholestatischen Lebererkrankungen in Frage, bei denen die Gallensäuresekretion in die Galle gestört ist. Die entwickelte Methode erlaubt die Bestimmung der Kinetik der primären Gallensäuren ohne Verwendung von Radioaktivität und ohne tägliche Duodenalintubation. Die Patientenbelastung bleibt auf 5 Blutentnahmen (5ml) beschränkt, wenn eine Blutprobe vor und

4 Proben nach der oralen Dosierung entnommen werden. Die Methode kann deshalb auch bei Kindern, bei Frauen im gebärfähigen Alter und selbst bei Schwangeren angewendet werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Zur Erfassung von Veränderungen des Gallensäurenstoffwechsels, verursacht durch hepatobiliäre und gastrointestinale Erkrankungen oder chirurgische Eingriffe, wird eine Methode mit folgenden Voraussetzungen gefordert. Die Methode soll für alle Patienten, d.h. unabhängig von Alter und Geschlecht, anwendbar und ohne große Patientenbelastung durchführbar sein. Die Methode soll über die Poolgrößen und Syntheseraten der beiden primären Gallensäuren Cholsäure und Chenodesoxycholsäure gleichzeitig Auskunft geben. Die übliche Isotopenverdünnungsmethode nach Lindstedt basiert auf der Messung spezifischer Aktivität in Duodenalgalle nach intravenöser Dosierung ^{14}C - oder ^3H -markierter Cholsäure oder Chenodesoxycholsäure. Dieses Verfahren ist wegen der Benutzung radioaktiv markierter Substanzen und wegen der Notwendigkeit der i.v. Injektion und der mehrfachen Duodenalintubationen nicht allgemein anwendbar. Eine alternative Methode besteht in der oralen Dosierung stabil markierter Gallensäuren, wobei der zu messende Markierungsgrad des Pools im Blut bestimmt wird. Die ersten Versuche in diese Richtung wurden von DeMark und Klein in klinischer Zusammenarbeit mit Everson und Kern durchgeführt, aber eine befriedigende Methode wurde bis heute nicht gefunden. Deshalb wurde ein eigenes Verfahren entwickelt, das in den zu erwartenden Serumkonzentrationsbereichen der primären Gallensäuren in geringen Serummenngen (1-2ml) durchführbar ist. Die erarbeitete Methode wurde bei 5 gesunden Probanden angewandt und die erzielten Ergebnisse mit den üblichen in der Literatur beschriebenen Normalwerten verglichen. Zusätzlich wurden bei 3 von 5 Normalpersonen die über Serum errechneten Werte direkt mit den über gleichzeitig gewonnene Duodenalgalleproben errechneten Werten verglichen.

Die niedrigen Konzentrationen der Gallensäuren im Serum von gesunden Probanden ($>0,08\mu\text{mol/l}$ für Cholsäure, $>0,35\mu\text{mol/l}$ für Chenodesoxycholsäure) und die große Zahl an Gallensäuren und anderen strukturähnlichen Lipiden im Serum stellen hohe Ansprüche an die Sensitivität und Selektivität der Methode. Außerdem ist eine Isotopentrennung erforderlich.

Die Voraussetzungen für die Erfüllung dieser Bedingungen wurden von einem kombinierten Kapillargaschromatographen/Massenspektrometer (Carlo Erba, Fractovap 4160/Finnigan 4021) erfüllt. Dazu wurden die Gallensäuren über Bond Elut C₁₈-Kartuschen extrahiert, desulphatiert und enzymatisch dekonjugiert. Die freien Gallensäuren wurden anschließend über Lipidex 1000 extrahiert, methyliert und trimethylsilyliert. Die entstandenen Methylester TMS-Ätherderivate wurden nach On column Injektion auf eine 25m x 0,32mm Quarzkapillarsäule mit chemisch gebundenem OV-1701, die direkt bis in die Ionenquelle des Massenspektrometers vorgeschoben wurde, getrennt. Die Isotopentrennung fand während der Elution der Substanz mittels Elektronenstoßfragmentierung (70eV) statt und wurde durch Selected Ion Monitoring (SIM) registriert. Hierzu wurden für Cholsäure die Massenionen m/z 458,459 und für Chenodesoxycholsäure m/z 370,371 ausgewählt. Zur Detektion dieser Ionen wurde ein Massenintervall von 0,125amu über das Massenzentrum mit einer Verweildauer von 50msec gescannt.

Für beide Isotopen wurden ungefähr 20 Messpunkte gesammelt, von denen wenigstens 10 nach Subtraktion des Backgrounds für die Berechnung eines mittleren Isotopenverhältnisses benutzt wurden. Diese Methode gewährleistete Variationskoeffizienten $< 1\%$ für die Isotopenverhältnismessungen für beide Gallensäuren bei Serumkonzentrationen ab 0,1 $\mu\text{mol/l}$.

Die gleichzeitige Bestimmung der Poolgrößen und Syntheseraten der primären Gallensäuren wurde bei 5 gesunden Probanden durchgeführt. Hierzu wurden 50mg der beiden Gallensäuren mit ¹³C in der C₂₄-Position markiert, oral dosiert und der Abfall des Markierungsgrades im Serum mittels Isotopenverhältnismessungen bestimmt. Die berechneten Poolgrößen betrugen $31,8 \pm 16,0 \mu\text{mol kg}^{-1}$ für Cholsäure und $32,6 \pm 9,9 \mu\text{mol kg}^{-1}$ für Chenodesoxycholsäure. Die Syntheserate für Cholsäure war $13,3 \pm 4,9 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$, die für Chenodesoxycholsäure $7,0 \pm 3,6 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Diese Werte stimmen gut mit den in der Literatur beschriebenen Werten überein, die mittels 24-¹⁴C-Gallensäuren und deren spezifischen Aktivitätsmessungen in der Galle bestimmt wurden.

Bei drei von fünf Probanden wurden die im Serum bestimmten Parameter durch Messungen in gleichzeitig gewonnener Duodenalgalle

validiert. Die über Serum bestimmten Poolgrößen für Cholsäure und Chenodesoxycholsäure stimmten sehr gut mit den in der Galle gefundenen Werten überein. Mit einer Ausnahme, betreffend die Cholsäuresynthese, stimmten auch die Syntheseraten gut überein. Bei dem einen abweichenden Fall war die Bestimmung möglicherweise dadurch beeinträchtigt, daß der systemische Pool (und damit die Serumkonzentration) von Cholsäure sehr niedrig war ($0,36\mu\text{mol}$; $0,01\%$ des Gesamtpools im Nüchternzustand).

Die Ergebnisse zeigen, daß die Bestimmung der Poolgrößen und Syntheseraten der primären Gallensäuren Cholsäure und Chenodesoxycholsäure bei gesichertem isotopischen Gleichgewicht zwischen dem systemischen und enterohepatischen Kreislauf und bei einem ausreichend großen systemischen Pool mittels Isotopenverhältnismessungen im Serum durchgeführt werden kann. Die für diesen Zweck entwickelte Methode verwendet keine Radioaktivität und erfordert keine wiederholten Duodenalintubationen, wie sie bei der ursprünglichen Lindstedt-Methode erforderlich waren.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Aldini R, Roda A, Morselli Labate AM, Capelleri G, Roda E, Barbara L. Hepatic bile acid uptake: effect of conjugation, hydroxyl and keto groups, and albumin binding. *J.Lipid Res.* 23, 1167-1173 (1982)
- 2 Ali, SS, Javitt NB. Quantitative estimation of bile salts in serum. *Can.J.Biochem.* 48, 1054-1057 (1970)
- 3 Allan RN, Thistle JC, Hofmann AF. Lithocholate metabolism during chenotherapy for gallstone dissolution. 2. absorption and sulfation. *Gut* 17, 413-419 (1976)
- 4 Almé B, Bremmelgaard A, Sjövall J, Thomassen P. Analysis of metabolic profiles of bile acids in urine using lipophilic anion exchanger and computerized gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *J.Lipid Res.* 18, 339-362 (1972)
- 5 Almond HR, Vlahcevic ZR, Bell Jr CC, Swell L. Bile acid pools, kinetics and biliary lipid composition before and after cholecystectomy. *N.Engl.J. Med.* 289, 1213-1216 (1973)
- 6 Angelin B, Einarsson K, Hellström K. Evidence for the absorption of bile acids in the proximal small intestine of normo- and hyperlipidaemic subjects. *Gut* 17, 420-425 (1976)
- 7 Anwer MS, Kroker R, Hegner D. Effect of albumin on bile acid uptake by isolated rat hepatocytes. Is there a common bile acid carrier? *Biochem.Biophys. Res.Comm.* 73, 63-71 (1976)
- 8 Aries V, Hill MJ. Degradation of steroids by intestinal bacteria. I. Deconjugation of bile acids. *Biochim.Biophys.Acta* 202, 526-534 (1970)
- 9 Aries V, Hill MJ. Degradation of steroids by intestinal bacteria. II. Enzymes catalysing the oxidoreduction of the 3 α -, 7 α - and 12 α -hydroxyl groups in cholic acid, and the dehydroxylation of the 7-hydroxyl group. *Biochim.Biophys.Acta* 202, 535-543 (1970)
- 10 Back P, Walter K. Developmental pattern of bile acid metabolism as revealed by bile acid analysis of meconium. *Gastroent.* 78, 671-676 (1980)
- 11 Barnes S, Pritchard DG, Settine RL, Geckle M. Preparation and characterisation of permethylated derivatives of bile acids, and their application to gaschromatographic analysis. *J.Chrom.Biomedical application* 183, 269-276 (1980)
- 12 Bazzoli F, Fromm H, Sarva RP, Sembrat RF, Ceryak S. Comparative formation of lithocholic acid from chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids in the colon. *Gastroent.* 83, 753-760 (1982)
- 13 Berg van den PMJ, Cox TPH. All glass solid sampling device for open tubular columns in gas chromatography. *Chromatographia* 5, 301-305 (1972)
- 14 Berge Henegouwen van GP, Hofmann AF. A simple batch adsorption procedure for the isolation of sulfated and non-sulfated bile acids from serum. *Clin.Chim.Acta* 73, 469-474 (1976)
- 15 Bloch K, Berg BN, Rittenberg D. The biological conversion of cholesterol to cholic acid. *J.Biol.Chem.* 149, 511-517 (1943)

- 16 Blum W, Richter WJ. Parallel flame ionization detection - total ion current recording in capillary gas chromatography - chemical ionization mass spectrometry. *J.Chrom.* 132, 249-259 (1977)
- 17 Boyd GS, Percy-Robb IW. Enzymatic regulation of bile acid synthesis. *Am.J.Med.* 51, 580-587 (1971)
- 18 Bremmelgaard A, Almé B. Analysis of plasma bile acid profiles in patients with liver disease associated with cholestasis. *Scand.J.Gastroent.* 15, 593-600 (1980)
- 19 Briggs T, Lipsky SR. The formation of partial trimethylsilyl ethers of bile acid methyl esters and their analysis by gas chromatography. *Biochim. Biophys.Acta* 97, 579-588 (1965)
- 20 Campbell IM. Incorporation and dilution values: their calculation in mass spectrally assayed stable isotopes labeling experiments. *Bioorg.Chem.* 3, 386-397 (1974)
- 21 Cannell GR, Calligan JP, Mortimer RH, Thomas MJ. Extraction of steroids from plasma with reversed phase C_{18} cartridges. *Clinica Chimica Acta* 122, 419-423 (1982)
- 22 Cowen AE, Korman MG, Hofmann AF, Cass OW, Coffin SB. Metabolism of lithocholate in healthy man. II. enterohepatic circulation. *Gastroent.* 69, 67-76 (1975)
- 23 Cowen AE, Korman MG, Hofmann AF, Thomas PJ. Plasma disappearance of radio-activity after intravenous injection of labeled bile acids in man. *Gastroent.* 68, 1567-1573 (1975)
- 24 Danzinger RG, Hofmann AF, Thistle JL, Schoenfield LJ. Effect of oral chenodeoxycholic acid on bile acid kinetics and biliary lipid composition in women with cholelithiasis. *J.Clin.Invest.* 52, 2809-2821 (1973)
- 25 Délèze G, Paumgartner G, Karlaganis G, Giger W, Reinhard M, Sidiropoulos D. Bile acid pattern in human amniotic fluid. *Eur.J.Clin.Invest.* 8, 41-45 (1978)
- 26 DeMark BR, Klein PD. Ammonia gas: an improved reagent for chemical ionization mass spectrometry of bile acid methyl ester acetates. *J.Lipid Res.* 22, 166-171 (1981)
- 27 DeMark BR, Everson GT, Klein PD, Showalter RB, Kern Jr.F. A method for the accurate measurement of isotope ratios of chenodeoxycholic and cholic acids in serum. *J.Lipid Res.* 23, 204-210 (1982)
- 28 Dietschy JM. Mechanisms for the intestinal absorption of bile acids. *J.Lipid Res.* 9, 297-309 (1968)
- 29 Dowling RH, Mack E, Small DM. Effects of controlled interruption of bile salts by biliary diversion and by ileal resection on bile salt secretion, synthesis, and pool size in the rhesus monkey. *J.Clin.Invest.* 49, 232-242 (1970)
- 30 Duane WC, Adler RD, Bennion LJ, Ginsberg RL. Determination of bile acid pool size in man: a simplified method with advantage of increased precision, shortened analysis time, and decreased isotope exposure. *J.Lipid Res.* 16, 155-158 (1975)
- 31 Duane WC, Hanson KC. Role of gallbladder emptying and small bowel transit in regulation of bile acid pool size in man. *J.Lab.Clin.Med.* 92, 858-872 (1978)

- 32 Edenharder R, Slemr J. Gas chromatographic and mass spectrometric analysis of bile acids as trifluoroacetyl-hexafluoroisopropyl and heptafluorobutyl derivatives. *J.Chrom., Biomed.Appl.* 222, 1-12 (1981)
- 33 Einarsson K, Hellström K, Kallner M. Bile acid kinetics in relation to sex, serum lipids, body weight, and gallbladder disease in patients with various types of hyperlipoproteinemia. *J.Clin.Invest.* 54, 1301-1311 (1974)
- 34 Elliott WH. Bile acids. In *Biochemical applications of mass spectrometry*. First supplementary volume. G. Waller and O.C. Dermer, editors. John Wiley and sons Inc, New York, 229-253 (1980)
- 35 Endo T, Uchida K, Amuro Y, Higashino K, Yamamura Y. Bile acid metabolism in benign recurrent intrahepatic cholestasis. Comparative studies on the icteric and anicteric phases of a single case. *Gastroent.* 76, 1002-1006 (1979)
- 36 Eneroth P, Gordon B, Ryhage R, Sjövall J. Identification of mono- and dihydroxy bile acids in human feces by gas liquid chromatography and mass spectrometry. *J.Lipid Res.* 7, 511-523 (1966)
- 37 Engelking LR, Barnes S, Dasher CA, Naftel DC, Hirschowitz BI. Radiolabelled bile acid clearance in control subjects and patients with liver disease. *Clinical Science* 57, 499-508 (1979)
- 38 Everson E, DeMark B, Klein P, Showalter R, McKinley C, Kern Jr. Measurement of cholic acid (CA) kinetics with ^{13}C -CA using serum: validation of method. *Gastroent.* 80, 1144 (abstract) (1981)
- 39 Everson G, Hachey D, Klein P, Showalter R, McKinley C, Kern Jr. F. Simultaneous serum and biliary chenodeoxycholic acid (CDC) kinetics using ^{13}C -CDC. *Gastroent.* 82, 1051 (abstract) (1982)
- 40 Farivar S, Fromm H, Schindler D, Schmidt FW. Sensitivity of bile acid breath test in the diagnosis of bacterial overgrowth in the small intestine with and without the stagnant (blind) loop syndrom. *Am.J.Dig.Dis.* 24, 33-40 (1979)
- 41 Fedorowski T, Salen G, Tint GS, Mosbach E. Transformation of chenodeoxycholic acid by human intestinal bacteria. *Gastroent.* 77, 1068-1073 (1979)
- 42 Fromm H, Hofmann AF. Breath test for altered bile acid metabolism. *The Lancet*, Sept.18, 621-625 (1971)
- 43 Fromm H, Carlson GL, Hofmann AF, Farivar S, Amin P. Metabolism in man of 7-ketolithocholic acid: precursor of cheno- and ursodeoxycholic acids. *Am.J.Physiol.* 239 (Gastrointest. Liver Physiol. 2), G 161-G 166 (1980)
- 44 Fujisawa K, Kitahara T, Ogura K, Kurihara N, Kameda H. Studies on the metabolic fate of chenodeoxycholic acid in human. *Gastroent.* 79, 1105 (abstract) (1980)
- 45 Garbutt JT, Lack L, Tryor MP. Physiological basis of alteration in the relative conjugation of bile acids with glycine and taurine. *Am.J.Clin.Nutr.* 24, 218-228 (1971)
- 46 Gilmore IT, Thompson RPH. Plasma clearance of oral and intravenous cholic acid in subjects with and without chronic liver disease. *Gut* 21, 123-127 (1980)

- 47 Goldman M, Vlahcevic R, Schwartz CC, Gustafsson J, Swell L. Bile acid metabolism in cirrhosis. VIII. Quantitative evaluation of bile acid synthesis from (7 β - ^{3} H) 7 α -hydroxycholesterol and (G- ^{3} H) 26-hydroxycholesterol. *Hepatology* 2, 59-66 (1982)
- 48 Gorbach SL, Tabaqchali S. Bacteria, bile, and the small bowel. *Gut* 10, 963-972 (1969)
- 49 Grob K, Grob G. Practical capillary gas chromatography - a systematic approach. *HRC & CC* 2, 109-117 (1979)
- 50 Hanson RF, Isenberg JN, Williams GC, Hachey D, Szczepanik PA, Klein PD, Sharp HL. The metabolism of 3 α , 7 α , 12 α -trihydroxy-5 β -cholestan-26-oic acid in two siblings with cholestasis due to intrahepatic bile duct anomalies: an apparent inborn error of cholic acid synthesis. *J.Clin.Invest.* 56, 577-587 (1975)
- 51 Hanson RF, Sharp HL, Williams GC. The metabolism of 3 α , 7 α , 12 α -trihydroxy-5 β -cholestan-26-oic acid into cholic acid: an enzyme assay using homogenates of human liver. *J.Lipid Res.* 17, 294-297 (1976)
- 52 Harvey DJ. Dimethoxymethylsilyl ethers: stable silyl derivatives for gas chromatography and mass spectrometry. *J.Chrom.* 196, 156-159 (1980)
- 53 Hepner GW, Hofmann AF, Malageda JR, Szczepanik PA, Klein PD. Increased bacterial degradation of bile acids in cholecystectomized patients. *Gastroent.* 66, 556-564 (1974)
- 54 Hepner GW. Effect of decreased gallbladder stimulation on enterohepatic cycling and kinetics of bile acids. *Gastroent.* 68, 1574-1581 (1975)
- 55 Hill MJ, Drasar BS, Williams RDO, Meade TW, Cox AG, Simpson JEP, Morton BC. Fecal bile acids and clostridia in patients with cancer of the large bowel. *Lancet* 1, 535-539 (1975)
- 56 Hill MJ. Metabolic epidemiology of dietary factors in large bowel cancer. *Cancer Res.* 35, 3398-3402 (1975)
- 57 Hirano S, Masuda N, Oda H. In vitro transformation of chenodeoxycholic acid and ursodeoxycholic acid by human intestinal flora, with particular reference to the mutual conversion between the two bile acids. *J.Lipid Res.* 22, 735-743 (1981)
- 58 Hofmann AF, Small DM. Detergent properties of bile salts: correlation with physiological function. *Ann.Rev.Med.* 18, 333-376 (1967)
- 59 Hofmann AF, Poley JR. Role of bile acid malabsorption in pathogenesis of diarrhea and steatorrhea in patients with ileal resection. 1. Response to cholestyramine or replacement of dietary long chain triglyceride by medium chain triglyceride. *Gastroent.* 62, 918-934 (1972)
- 60 Hofmann AF, Hoffman NE. Measurement of bile acid kinetics by isotope dilution in man. *Gastroent.* 67, 314-323 (1974)
- 61 Huybregts AWM, van Schaik A, van Berge Henegouwen GP, van der Werf SDJ. Serum lipids, biliary lipid composition, and bile acid metabolism in vegetarians as compared to normal controls. *European J.Clin.Invest.* 10, 443-449 (1980)
- 62 Huybregts AWM, van Berge Henegouwen GP, Hectors MPC, van Schaik A, van der Werf SDJ. Effects of a standardized wheat bran preparation on biliary lipid composition and bile acid metabolism in young healthy males. *European J.Clin.Invest.* 10, 451-458 (1980)

- 63 Iga T, Klaassen CD. Hepatic extraction of bile acids in rats. *Biochemical Pharmacology* 31, 205-209 (1982)
- 64 Kalek H-D, Stellaard F, Kruis W, Paumgartner G. Detection of increased bile acid excretion by determination of bile acid content in single stool samples. *Clin.Chim.Acta* in press (1984)
- 65 Kallner M. The effect of chenodeoxycholic acid feeding on bile acid kinetics and fecal neutral steroid excretion in patients with hyperlipoproteinemia types II and IV. *J.Lab.Clin.Med.* 86, 595-604 (1975)
- 66 Karlaganis G, Paumgartner G. Determination of bile acids in serum by capillary gas-liquid chromatography. *Clin.Chim.Acta* 92, 19-26 (1979)
- 67 Karlaganis G, Schwarzenbach RP, Paumgartner G. Analysis of serum bile acids by capillary gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *J.Lipid Res.* 21, 377-385 (1980)
- 68 Kay RM. Effects of diet on the fecal excretion and bacterial modification of acidic and neutral steroids, and implications for colon-carcinogenesis. *Cancer Res.* 41, 3774-3777 (1981)
- 69 Kern F, Everson GT, DeMark B, McKinley C, Showalter R, Erfling W, Braverman DZ, Szczepanik-Van Leeuwen, Klein PD. Biliary lipids, bile acids, and gall-bladder function in the human female. Effects of pregnancy and the ovulatory cycle. *J.Clin.Invest.* 68, 1229-1242 (1981)
- 70 Klein PD, Haumann JR, Hachey DL. A stable isotope ratio-metric-multiple ion detector (SIRIMID) unit for quantitative and qualitative stable isotope studies by gas chromatography-mass spectrometry. *Clin.Chem.* 21, 1253-1257 (1975)
- 71 Knodell RG, Kinsey MD, Boedeker EC, Collin DP. Deoxycholate metabolism in alcoholic cirrhosis. *Gastroent.* 71, 196-201 (1976)
- 72 Krag E, Phillips SF. Active and passive bile acid absorption in man. Perfusion studies of the ileum and jejunum. *J.Clin.Invest.* 53, 1686-1694 (1974)
- 73 Kuriyama K, Ban Y, Nakashima T, Murata T. Simultaneous determination of biliary bile acids in rat: Electron Impact and ammonia chemical ionization mass spectrometric analyses of bile acids. *Steroids* 34, 717-728 (1979)
- 74 Laatikainen T, Hesso A. Determination of serum bile acids by glass capillary gas-liquid chromatography. *Clinica Chimica Acta* 64, 63-68 (1975)
- 75 Lindstedt S. The turnover of cholic acid in man. *Acta Physiol.Scand.* 40, 1-9 (1957)
- 76 Lipsky SR, McMurray WJ, Hernandez M, Purcell JE, Billet KA. Fused silica glass capillary columns for gas chromatographic analyses. *J.Chrom.Science* 18, 1-9 (1980)
- 77 Low-Beer TS, Tyor MP, Lack L. Effects of sulfation of tauroolithocholic and glycolithocholic acids on their intestinal transport. *Gastroent.* 56, 721-726 (1969)
- 78 Luey KL, Heaton KW. Bile acid clearance in liver disease. *Gut* 20, 1083-1087 (1979)
- 79 Macdonald IA, Singh G, Mahony DE, Meier CE. Effect of pH on bile salt degradation by mixed fecal cultures. *Steroids* 32, 245-256 (1978)
- 80 McFadden WH. Liquid chromatography/mass spectrometry systems and applications. *J.Chrom.Science* 18, 97-115 (1980)

- 81 Makino I, Sjövall J. A versatile method for analysis of plasma. *Ann. Letters* 5, 341-349 (1972)
- 82 Makino I, Shinozaki K, Nakogawa S, Mashino K. Measurement of sulfated and non sulfated bile acids in human serum and urine. *J.Lipid Res.* 15, 132-138 (1974)
- 83 Matsui T, Staple E. The formation of bile acids from cholesterol: the conversion of 5 β -cholestane-3 α , 7 α , 12 α -triol-26-oic acid to cholic acid via 5 β -cholestane-3 α , 7 α , 12 α , 24 -tetrol-26-oic acid by the rat liver. *J.Biol.Chem.* 241, 3889-3893 (1966)
- 84 Mazer NA, Benedek GB, Carey MC. Quasielastic light scattering studies of aqueous biliary lipid systems. Mixed micelle formation in bile salt-lecithine solutions. *Biochem.* 19, 601-615 (1980)
- 85 Miyasaki H, Ishibashi M, Yamashita K. Use of a new silylating agent for separation of bile acids and cholesterol by selected ion monitoring with the computer controlled intensity matching technique. *Biomed. Mass Spec.* 5, 469-476 (1978)
- 86 Mok HYI, von Bergmann K, Grundy SM. Regulation of pool size of bile acids in man. *Gastroent.* 73, 684-690 (1977)
- 87 Mok HYI, von Bergmann K, Grundy SM. Kinetics of the enterohepatic circulation during fasting: biliary lipid secretion and gallbladder storage. *Gastroent.* 78, 1023-1033 (1980)
- 88 Moskovitz M, White C, Barnett R, Stevens S, Russell E, Vargo D, Flock MH. Diet, Fecal bile acids, and neutral sterols in carcinoma of the colon. *Dig.Dis. and Sci.* 24, 746-751 (1979)
- 89 Motson RW, Hammerman KJ, Admirand WH, Way LW. Effect of chronic changes in rate of enterohepatic cycling on bile acid kinetics and biliary lipid composition in the rhesus monkey. *Gastroent.* 80, 655-660 (1981)
- 90 Murata T, Takahashi S, Ohnishi S, Hosoi K, Nakashima T, Ban Y, Kuriyama K. Characterization of bile acid methyl ester acetate derivatives of rat bile using solventless glass capillary gas chromatography and electron impact and ammonia chemical ionization mass spectrometry. *J.Chrom.* 239, 571-583 (1982)
- 91 Munson B, Field F.H. Physical and Inorganic chemistry. Chemical Ionisation Mass Spectrometry I. General Introduction. *J.Amer.Chem. Soc.* 88, 2621-2630 (1966)
- 92 Muschik GM, Wright LH, Schroer JA. The identification of bile acid methyl esters by gas chromatography methane chemical ionization mass spectrometry. *Biomed. Mass Spec.* 6, 266-270 (1979)
- 93 Nair PP, Garcia C. A modified gas-liquid chromatographic procedure for the rapid determination of bile acids in biological fluids. *Anal.Biochem.* 29, 164-171 (1969)
- 94 Nishida T, Miwa H, Yamamoto M, Koga T, Yao T. Bile acid absorption kinetics in Crohn's disease on elemental diet after oral administration of a stable isotope tracer with chenodeoxycholic 11, 12-d₂ acid. *Gut* 23, 751-757 (1982)

- 95 Northfield TC, Hofmann AF. Biliary output during three meals and an overnight fast. I. Relationship to bile acid pool size and cholesterol saturation of bile in gallstone patients and control subjects. *Gut* 16, 1-11 (1975)
- 96 Northfield TC, Hofmann AF. Biliary output during three meals and an overnight fast. II. Effect of chenodeoxycholic acid treatment in gallstone subjects. *Gut* 16, 11-17 (1975)
- 97 Palmer RH. The formation of bile acid sulfates: a new pathway of bile acid metabolism in humans. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 58, 1047-1050 (1967)
- 98 Palmer RH, Bolt MG. Bile acid sulfates. I. Synthesis of lithocholic acid sulfates and their identification in human bile. *J.Lipid Res.* 12, 671-679 (1971)
- 99 Patteson TE, Vlahcevic ZR, Schwartz CC, Gustafsson J, Danielsson H, Swell L. Bile acid metabolism in cirrhosis. VI. Sites of blockage in the bile acid pathways to primary bile acids. *Gastroent.* 79, 620-628 (1980)
- 100 Paumgartner G. Diagnose des Gallensäurenverlustsyndroms. *Therapiewoche* 29, 7877-7885 (1979)
- 101 Peled Y, Levy-Gigi C, Ayalon D, Gilat T. The cholyglycine-1-¹⁴C breath test in various gastrointestinal disorders. *Digestion* 19, 267-276 (1979)
- 102 Pomare EW, Heaton KW. Increased bacterial degradation of bile salts in cholecystectomized subjects. In *Bile acids in human diseases*. P.Back and W.Gerok editors, Stuttgart 209-213 (1972)
- 103 Pomare EW, Low-Beer Th.S. Measurement and validation of human bile salt pool size and synthesis. *Clinica Chimica Acta* 57, 239-248 (1974)
- 104 Pries JM, Gustafson A, Wiegand D, Duane WC. Taurocholate is more potent than cholate in suppression of bile salt synthesis in the rat. *J.Lipid Res.* 24, 141-146 (1983)
- 105 Roda A, Cappelleri G, Aldini R, Roda E, Barbara L. Quantitative aspects of the interaction of bile acids with human serum albumin. *J.Lipid Res.* 23, 490-495 (1982)
- 106 Roovers J, Evrard E, Vanderhaeghe H. An improved method for measuring human blood bile acids. *Clinica Chimica Acta* 19, 449-457 (1968)
- 107 Rutgeerts P, Ghooys Y, Vantrappen G. Bile acid studies in Crohn's Colitis. *Gut* 20, 1072-1077 (1979)
- 108 Rutgeerts P, Ghooys Y, Vantrappen G. Kinetics of primary bile acids in patients with non-operated Crohn's disease. *European J.Clin.Invest.* 12, 135-143 (1982)
- 109 Salvioli G, Salati R. Faecal bile acid loss and bile acid pool size during short-term treatment with ursodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid in patients with radiolucent gallstones. *Gut* 20, 698-704 (1979)
- 110 Samuelsson B. bile acids and steroids. On the mechanism of the biological formation of deoxycholic acid from cholic acid. *J.Biol.Chem.* 235, 361-366 (1960)
- 111 Sandberg DH, Sjövall J, Sjövall K, Turner DA. Measurement of human serum bile acids by gas liquid chromatography. *J.Lipid Res.* 6, 182-192 (1965)
- 112 Sarva RP, Fromm H, Carlson GL, Mendelow L, Ceryak S. Intracolonic conversion in man of chenodeoxycholic acid (CDC) to ursodeoxycholic acid (UDC) with and without formation of 7-ketolithocholic acid (KLC) as an intermediate. *Gastroent.* 78, 1252,abstr(1980)

- 113 Sauerbruch T, Stellaard F, Paumgartner G. Effect of endoscopic sphincterotomy on bile acid pool size and bile lipid composition in man. *Digestion* 27, 87-92 (1983)
- 114 Schaffer EA, Braasch JW, Small DM. Bile composition at and after surgery in normal persons and patients with gallstones. Influence of cholecystectomy. *N.Engl.J.Med.* 289, 1317-1322 (1972)
- 115 Schaffer EA, Small DM. Biliary lipid secretion in cholesterol gallstone disease. *J.Clin.Invest.* 59, 828-840 (1977)
- 116 Schefer S, Cheng FW, Dayal B. A 25-hydroxylation pathway of cholic acid biosynthesis in man and rat. *J.Clin.Invest.* 57, 897-903 (1976)
- 117 Schefer S, Hauser S, Bekersky I, Mosbach EH. Feedback regulation of bile acid biosynthesis in the rat. *J.Lipid Res.* 10, 646-655 (1969)
- 118 Schlenk H, Gellerman JL. Esterification of fatty acids with diazomethane on a small scale. *Anal.Chem.* 32, 1412-1414 (1960)
- 119 Setchell KDR, Matsui A. Serum bile acid analysis. *Clin.Chim.Acta* 127, 1-17 (1982)
- 120 Setchell KDR, Worthington J. A rapid method for the quantitative extraction of bile acids and their conjugates from serum using commercially available reverse-phase octadecylsilane bonded silica cartridges. *Clin.Chim.Acta* 125, 135-144 (1982)
- 121 Shackleton GHL, Whitney JO. Use of Sep-pack^R cartridges for urinary steroid extraction: evaluation of the method for use prior to gas chromatographic analysis. *Clinica Chimica Acta* 107, 231-243 (1980)
- 122 Sjövall J. Bile acids in man under normal and pathological conditions. *Clinica Chimica Acta* 5, 33-41 (1960)
- 123 Sjövall J, Sjövall J. Serum bile acids in pregnancy with pruritus. *Clinica Chimica Acta* 13, 207-211 (1966)
- 124 Sjövall J, Eneroth P, Ryhage R. Mass spectra of bile acids. In: *Chemistry, Physiology and metabolism*. Vol.I. PP Nair, and D Kritchevsky, editors. Plenum Press, New York. 209-248 (1971)
- 125 Stellaard F, Szczepanik-Van Leeuwen PA. Identification of atypical bile acids by gas chromatography-mass spectrometry techniques. In: *Recent developments in mass spectrometry in biochemistry and medicine*. Vol.2. Alberto Frigerio editor. Plenum Publishing Corp. New York (1979)
- 126 Stellaard F, Bolt MG, Boyer JL, Klein PD. Phenobarbital treatment in primary biliary cirrhosis. Differences in bile acid composition between responders and non-responders. *J.Lab.Clin.Med.* 94, 853-861 (1979)
- 127 Stellaard F, Sauerbruch T, Brunhölzl Ch, Soehendra N, Paumgartner G. Bile acid pattern and cholesterol saturation of bile after cholecystectomy and endoscopic sphincterotomy. *Digestion* 26, 153-158 (1983)
- 128 Stellwag EJ, Hylemon PB. Purification and characterization of bile salt hydrolase from *bacteroides fragilis* subsp. *fragilis*. *Biochim.Biophys.Acta* 452, 165-176 (1976)
- 129 Stellwag EJ, Hylemon PB. ω -dehydroxylation of cholic acid and chenodeoxycholic acid by *clostridium leptum*. *J.Lipid Res.* 20, 325-333 (1979)

- 130 Stiehl A, Ast E, Czygan P, Fröhling W, Raedsch R, Kommerell B. Pool size, synthesis, and turnover of sulfated and nonsulfated cholic acid in patients with cirrhosis of the liver. *Gastroent.* 74, 572-577 (1978)
- 131 Subbiah, Tyler NE, Buscaglia MD, Marai L. Estimation of bile acid excretion in man: comparison of isotopic turnover and fecal excretion methods. *J.Lipid Res.* 17, 78-84 (1976)
- 132 Szczepanik PA, Hachey DL, Klein PD. Characterization of bile acid methyl ester acetate derivatives using gas-liquid chromatography, electron impact, and chemical ionization mass spectrometry. *J.Lipid Res.* 17, 314-334 (1976)
- 133 Szczepanik-Van Leeuwen PA, Stellaard F. Detection of atypical bile acids in disease states and their identification by gas chromatography-mass spectrometry-computer techniques. In: biological effects of bile acids. Paumgartner G ed., MTP Press Ltd, Lancaster, p 287-298 (1979)
- 134 Tabagchali S, Hatzioannou J, Booth CC. Bile salt deconjugation and steatorrhea in patients with the stagnant loop syndrom. *Lancet* 2, 12-16 (1968)
- 135 Vantrappen G, Ghoois Y, Rutgeerts P, Janssens J. Bile acid studies in uncomplicated Crohn's disease. *Gut* 18, 730-735 (1977)
- 136 Vantrappen G, Rutgeerts P, Ghoois Y. A new method for the measurement of bile acid turnover and pool size by a double label, single intubation technique. *J.Lipid Res.* 22, 528-531 (1981)
- 137 Vlahcevic ZR, Bell Jr CC, Buhac I, Farrar JT, Swell L. Diminished bile acid pool size in patients with gallstones. *Gastroent.* 59, 165-173 (1970)
- 138 Vlahcevic ZR, Buhac I, Bell Jr CC, Swell L. Abnormal metabolism of secondary bile acids in patients with cirrhosis. *Gut* 11, 420-422 (1970)
- 139 Watkins JB, Ingall D, Klein PD, Lester R, Szczepanik PA. Bile salt metabolism in the newborn. Measurement of pool size and synthesis by stable isotope technique. *N.Engl.J.Med.* 288, 431-434 (1967)
- 140 Watkins JB, Szczepanik PA, Gould JB, Klein PD, Lester R. Bile salt metabolism in the human premature infant: preliminary observation of pool size and synthesis rate following the prenatal administration of dexamethasone and phenobarbital. *Gastroent.* 69, 706-713 (1975)
- 141 Werf van der SDJ, Nagengast FM, van Berge Henegouwen GP, Huybregts AWM, van Tongeren JHM. Colonic absorption of secondary bile acids in patients with adenomatous polyps and in matched controls. *The Lancet* 759-761 (1982)
- 142 Werf van der SDJ, Huybregts AWM, Lamers HLM, van Berge Henegouwen GP, van Tongeren JHM. Age dependent differences in human bile acid metabolism and 7α -dehydroxylation. *Eur.J.Clin. Invest* 11, 425-431 (1981)
- 143 White BA, Fricke RJ, Hylemon PB. 7β -dehydroxylation of ursodeoxycholic acid by whole cells and cell extracts of the intestinal anaerobic bacterium, *Eubacterium* species VPI 12708. *J.Lipid Res.* 23, 145-153 (1982)

APPENDIX 1

Aufarbeitung von Serumproben zur Bestimmung der Gallensäuren-kinetik

Vorbereitung der Bond Elut-Säulen: Vor Verwendung mit 5ml Methanol, 5ml bidest. Wasser und 5ml 0,1N NaOH waschen.

Vorbereitung der Lipidex 1000 - Säulen: Auf leere 1ml Bond Elut-Säule mit 2 Filterplättchen DEAP-Lipidex in Methanol geben und durchsaugen. Ganze Säule füllen und mit 10ml Methanol und 3ml 0,01N HCL waschen.

Vorbereitung der TMS-Lösung: Pyridin über BaO refluxieren und destillieren. Mischung von Trimethylchlorsilan/Hexamethyldisilan/Pyridin, 1/2/3 v/v frisch zubereiten und zentrifugieren. Unter N₂ aufbewahren.

50µl Hyodesoxycholsäurelösung (Int. Std., 50µg/ml in Methanol) in dünne Schliffstopfengläser pipettieren und Methanol unter N₂ abblasen.

2ml Serum und 8ml 0,1N NaOH zugeben und 5 min im Ultraschallbad stehenlassen. Anschließend die Proben 15 min ins Wasserbad bei 64°C stellen.

Die Proben auf die vorbereiteten 1ml Bond Elut - Säulen geben und nach 1 min langsam (1-2ml/min) durchsaugen mit Hilfe einer Vac Elut-Vorrichtung.

Die Säulen mit 5ml 0,1N NaOH und 5ml bidest. Wasser waschen (die Schliffstopfengläser damit auswaschen) und die Gallensäuren mit 6ml Methanol/Wasser, 75/25 in dicke Schliffstopfengläser eluieren. Dann mit 0,1N HCL auf pH 3,5 ansäuern und dreimalig mit je 5ml Hexan ausschütteln, Hexan verwerfen.

Proben im Wasserbad bei 50°C unter N₂ eindampfen.

Zur Solvolyse den Rückstand in 1ml 1N HCL in Methanol und 9ml Aceton zusammen mit 1ml 2,2 Dimethoxypropan zugeben. Nach 1 min

im Ultraschallbad 3 Stunden in Wasserbad bei 37°C stellen, dann mit 1ml 1N NaOH in Methanol neutralisieren und im Wasserbad bei 50°C unter N₂ eindampfen.

Zur enzymatischen Hydrolyse den Rückstand in 4ml bidest. Wasser aufnehmen und den pH auf 5,8-6,0 einstellen mit 0,2N Essigsäure. Dann 0,4ml Acetatpuffer zugeben und 1 min ins Ultraschallbad stellen. Nach Zugabe von 20 Einheiten Enzym (20µl Lösung), 100µl 0,2N EDTA und 100µl 0,2N Mercaptoethanol die Proben zugedeckt im Wasserbad bei 37°C über Nacht stehen lassen.

Die Lösung dann mit 1N HCl auf pH 3,5 bringen und über die vorbereitete Lipidex 1000-Säule führen (1-2ml/min). Die Säulen mit 3 x 5ml 0,01N HCl und 2 x 10ml bidest. Wasser waschen (Schliffstopfengläser damit auswaschen). Die Gallensäuren anschließend mit 10ml Methanol/Wasser (75/25) in dicke Schliffstopfengläser eluieren. Die Lösung wird bei 50°C unter N₂ eingedampft.

Zur Methylierung an den Rückstand 1ml Methanol, 1ml 2,2 Dimethoxypropan und 25µl konz. HCl zugeben. Nach 30 min bei Zimmertemperatur die Lösung bei 50°C im Wasserbad unter N₂ eindampfen.

Zur Silylierung unter N₂ 1ml frische TMS-Lösung zugeben und die Reaktion bei 60°C im Wasserbad 15 min durchführen. Unter Durchführung von N₂ anschließend eindampfen und die Probe in 1,5ml Iso-Octan aufnehmen. Diese Lösung jetzt in Mini-vials überführen und bei Zimmertemperatur eindampfen. Abschließend den Rückstand in 50µl Iso-Octan lösen. Die Silylierungsreaktion wird erst kurz vor der Bestimmung durchgeführt.

DANKWORT

An erster Stelle möchte ich Professor Dr. G.Paumgartner danken, der alle Voraussetzungen zur Durchführung dieser Arbeit geschaffen und mein Interesse für den Gallensäurenstoffwechsel stark gefördert hat.

Die praktische Grundlage für die Untersuchungen konnte ich mir im Argonne National Laboratory in den USA erwerben. Besonders beeinflusst haben mich hier Dr. P.D.Klein, Dr. D.L.Hachey und Mrs. P.A.Szczepanik-Van Leeuwen.

Mein Dank gilt auch besonders Frau König, Frau Dyck und Frau Nuber, deren Hilfe für den praktischen Teil unentbehrlich war, und die nebenbei auch noch unermüdlich Kaffee zubereitet haben.

Die Zusammenarbeit mit den Gastroenterologen der II. Med. Klinik war mir eine große Unterstützung. Hauptsächlich waren es Dr. T.Sauerbruch und Herr M.Sackmann, die sich um die Blut- und Gallenabnahmen kümmerten.

Für die Schreibarbeiten danke ich den Sekretärinnen Frau Steinberg, Frau Nitsche und Frau Jechart. Schließlich hätte diese Dissertation nicht entstehen können ohne die Mitarbeit von Frau Neumann und Frau Depperich von der grafischen Abteilung und das geduldige Abtippen von Frau Englmüller.

LEBENS LAUF

Der Autor dieser Dissertation wurde am 15. Februar 1948 in Tiel in den Niederlanden geboren. Hier besuchte er die Grundschule und die "Hogere Burgerschool", die er 1966 mit dem HBS-B-Diplom abschloß. Von 1966 bis 1971 studierte er an der Abteilung für Chemische Verfahrenstechnik der Fachhochschule in Dordrecht in den Niederlanden. Anschließend setzte er sein Studium in der gleichen Fachrichtung an der Technischen Universität Eindhoven in den Niederlanden fort. 1975 erhielt er sein Diplom. Die Diplomarbeit beschäftigte sich mit der kapillargaschromatografischen Bestimmung von Neurotransmittern im Liquor. Von Januar 1976 bis Oktober 1979 war er im Argonne National Laboratory in Chicago/USA im Massenspektrometrielabor der Abteilung für biologische und medizinische Forschung tätig (Direktor Dr. P.D.Klein). Hier beschäftigte er sich mit dem gaschromatografisch/massenspektrometrischen Nachweis atypischer Gallensäuren bei Gallensteinpatienten unter Chenodesoxycholsäuretherapie (National Cooperative Gallstone Study) und bei Patienten mit verschiedenartigen Lebererkrankungen. Seit November 1979 arbeitet er in der II. Med. Klinik im Klinikum Großhadern der LMU-Universität in München (Direktor Prof. Dr. G.Paumgartner). Er leitet das Labor für hepatobiliäre und klinisch pharmakologische Forschung und beschäftigt sich u.a. weiterhin mit gaschromatografisch/massenspektrometrischen Bestimmungsmethoden zur Untersuchung des Gallensäurenstoffwechsels bei verschiedenartigen hepatobiliären und gastrointestinalen Erkrankungen.

PUBLIKATIONSLISTE

- F.Stellaard, D.L. Hachey, P.D.Klein. Separation of bile acids as their phenacyl esters by high-pressure liquid chromatography. *Anal.Biochem.* 87, 359-366 (1978)
- F.Stellaard and P.A. Szczepanik-Van Leeuwen. Identification of atypical bile acids by gas chromatography-mass spectrometry techniques. In *Recent developments in mass spectrometry in biochemistry and medicine*, Alberto Frigerio ed., Plenum publishing corp. New York, p. 297-306 (1979)
- F.Stellaard, M.G.Bolt, J.L.Boyer and P.D.Klein. Phenobarbital treatment in primary biliary cirrhosis. Differences in bile acid composition between responders and nonresponders. *J. Lab. Clin. Med.* 94, 853-861 (1979)
- P.A. Szczepanik-Van Leeuwen and F.Stellaard. Detection of atypical bile acids in disease states and their identification by gas chromatography-mass spectrometry-computer techniques. In *Biological effects of bile acids*, G.Paumgartner ed. MTP press limited, Lancaster, p. 287-299 (1979)
- G.A.Mannes, F.Stellaard, G.Paumgartner. Increased serum bile acids in cirrhosis with normal transaminases. *Digestion* 25, 217-221 (1982)
- F.Stellaard, G.A. Mannes, G.Paumgartner. Il dosaggio degli biliari nel siero (metodi e significato clinico). *Clinica e laboratorio* 6, 118-126 (1982)
- F.Stellaard, T.Sauerbruch, C.Brunhölzl, N.Soehendra, G.Paumgartner. Bile acid pattern and cholesterol saturation of bile after cholecystectomy and endoscopic sphincterotomy. *Digestion* 26, 153-158 (1983)
- T.Sauerbruch, F.Stellaard, G.Paumgartner. Effect of endoscopic sphincterotomy on bile acid pool size and bile lipid composition in man. *Digestion* 27, 87-92 (1983)
- G.Paumgartner, G.A.Mannes and F.Stellaard. Serum bile acids and bile acid tolerance test in liver disease. In *Bile acids in gastroenterology*, L.Barbara ed. MTP press limited, Lancaster, p 217-221 (1983)
- H.D.Kalek, F.Stellaard, W.Kruis, G.Paumgartner. Eine einfache Methode zum Nachweis eines Gallensäurenverlustes bei entzündlichen Darmerkrankungen. In *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für innere Medizin.* 89. Band, 868-869 (1983)
- F.Stellaard, R.Schubert and G.Paumgartner. Measurement of bile acid kinetics in human serum using stable isotope labeled chenodeoxycholic acid and capillary gas chromatography electron impact mass spectrometry. *Biom. Mass Spectrom.* 10, 187-191 (1983)
- T.Sauerbruch, F.Stellaard, N.Soehendra und G.Paumgartner. Cholesteringehalt von Gallengangssteinen. *DMW* 28, 1099-1102 (1983)

- T.Sauerbruch, F.Stellaard, C.Brunhölzl, N.Soehendra and G.Paumgartner. Bile acid pattern and cholesterol saturation of bile after cholecystectomy and endoscopic sphincterotomy. In Bile acids and cholesterol in health and disease, G.Paumgartner ed., MTP press limited, Lancaster, p. 279-283 (1983)
- A.G.Mannes, M.Weinzierl, F.Stellaard, C.Thieme, B.Wiebecke and G.Paumgartner. Adenomas of the large intestine after cholecystectomy. Gut 25, 863-866 (1984)
- H.D.Kalek, F.Stellaard, W.Kruis and G.Paumgartner. Detection of increased bile acid excretion by determination of bile acid content in single stool samples. Clin. Chim. Acta 140, 85-90 (1984)
- F.Stellaard, M.Sackmann, T.Sauerbruch and G.Paumgartner. Simultaneous determination of cholic acid and chenodeoxycholic acid pool sizes and fractional turnover rates in human serum using ^{13}C labeled bile acids. J. Lipid Res. accepted (1984)
- F.Stellaard and G.Paumgartner. Measurement of isotope ratios in organic compounds at picomole quantities using capillary gas chromatography quadrupole EI mass spectrometry. Biomed. Mass Spectrom. accepted (1984)
- F.Stellaard, P.D. Klein, A.F.Hofmann and J.M.Lachin. Mass spectrometry identification of biliary bile acids in bile from gallstone patients before and during treatment with chenodeoxycholic acid. J. Lab. Clin. Med., submitted (1984)
- C.Scheurlen, W.Kruis, U.Büll, F.Stellaard, P.Lang and G.Paumgartner. Comparison of $^{75}\text{SeHCA}$ T retention half-life and fecal content of individual bile acids in patients with chronic diarrheal disorders. Dig. Dis. and Sci. submitted (1984)
- F.Stellaard, M.Sackmann, T.Sauerbruch, G.Paumgartner. Gleichzeitige Bestimmung der Poolgrößen und fraktionellen Umsatzraten von Cholsäure (CA) und Chenodesoxycholsäure (CDCA) im menschlichen Serum mittels ^{13}C -CA und ^{13}C -CDCA. In Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für innere Medizin. 90. Band (1984)

